

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. Д-р. Параскев Стоянов”, гр. Варна
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И
НУТРИГЕНОМИКА**

**Проучване на мутации и експресия на гени,
корелиращи с изявата на колоректален
карцином**

АВТОРЕФЕРАТ

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА
СТЕПЕН “ДОКТОР”**

ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: 01.06.10 – БИОХИМИЯ

НА

Д-р Пантелис Теофанис Димарас

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ПРОФ. ДБН ДИАНА ИВАНОВА**

ВАРНА

2017

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 141 страници, 49 фигури и 6 таблици. Цитирани са 157 заглавия.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в:

- Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.

В сътрудничество с:

- Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология;
- Катедрата по обща и оперативна хирургия;
- Катедрата по предклинични и клинични науки.

Защитата на дисертационния труд ще се проведегодина от часа в на Медицински университет – Варна.

Съдържание

Въведение	5
Колоректален карцином	5
Епидемиология	5
Механизмите на взаимодействие между SIRT6, FOXO4, HIF3A, miR-134, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375	7
KRAS/NRAS сигнализираща каскада	8
Роля на микроРНК-ите при раковите заболявания	8
Цел и задачи	9
Цел	9
Задачи	9
Материали и методи	10
Материали	10
Подбор на пациенти	10
Пробовземане и подготовка на тъканта	10
Методи	10
Приготвяне на FFPE тъканни срези	10
Оптимизиране на протоколите за молекулен анализ. Ход на работа	11
Екстракция на РНК	12
Синтез на кДНК	12
кДНА преамплифициране	12
Количествен PCR анализ	12
Откриване на KRAS/NRAS мутации	12
Депарафинизиране	13
РНК екстракция	13
РНК добив и чистота	13
Пречистване на РНК чрез третиране с ДНКаза	13
Синтез на кДНК за генна експресия	13
Преамплифициране на кДНК за генна експресия	13
Синтез на кДНК за експресия на миРНК	14
Преамплификация на кДНК за експресия на миРНК	14
Количествен PCR анализ	14
Статистически анализ	15
Резултати	16

Оптимизиране на протокола за молекулен анализ – добив и чистота на РНК, количествен RT-PCR	16
Сравнение на РНК добив и чистота при различни екстракционни методи	16
Количествен RT-qPCR.....	16
Относителна стандартна крива	19
Стадиране на пациенти с КРК	20
RAS мутационен статус на пациентите с КРК.....	20
RAS мутационен профил на пациенти с КРК	21
SIRT6, FOXO4, HIF3A експресия при пациенти с КРК	21
Корелационен анализ на генните експресии на SIRT6, FOXO4, HIF3A	26
Expression levels of miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b and miR-375	36
Корелационен анализ между мРНК и SIRT6, FOXO4 и HIF3A.....	39
Дискусия	43
Оптимизиран протокол за молекулен анализ	43
Стадиране на пациентите и RAS мутационен статус и профил.....	45
Експресионен анализ на SIRT6.....	45
Експресионен анализ на FOXO4	46
Експресионен анализ на HIF3A.....	47
Корелационен анализ на експресията между SIRT6, FOXO4, HIF3A.....	48
Експресионен анализ на избрани зрели miRNA.....	49
miRNA-143.....	49
miRNA-200c.....	49
miRNA-101.....	49
miRNA-34b	50
miRNA-375.....	50
Корелационен анализ на miRNAs и SIRT6, FOXO4, HIF3A	51
Заклучение	53
Изводи и приноси	55
Изводи	55
Приноси	57
Финансиране.....	58
Списък на често използваните съкращения.....	59
Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд	60

Въведение

Колоректалният карцином е един от най-често срещаните се ракови заболявания в световен мащаб. Това е хетерогенно заболяване, причинено от генетични и екологични фактори. През последните години има голям напредък в изследванията на молекулярно ниво при колоректалния карцином за идентифициране на генни мутации и промени, транскрипционни и епигенетични модификации, протеинови и биомолекулни промени, както и взаимодействия между тях за прогностични, диагностични и терапевтични цели. В настоящото изследване се съсредоточихме върху анализа на експресията на три гена, а именно sirtuin 6 (SIRT6), forkhead box O4 (FOXO4) и hypoxia inducible factor 3A (HIF3A), които са свързани с енергийното метаболитно препрограмиране, ключов отличителен белег при колоректални тумори. Освен това решихме да изучим експресионните нива на пет микроРНК, а именно miR-143, miR-101, miR-200c, miR-34b и miR-375, свързани и с енергийното метаболитно препрограмиране. Бяха анализирани и туморите за RAS мутационния им статус - стандартна молекулярна диагностична процедура, която се провежда рутинно в нашата лаборатория. Тъй като е доказано, че онкогенът на RAS е замесен в препрограмирането на метаболизма на раковите клетки, ние избрахме да корелираме резултатите от експресионния анализ на протеин кодиращите гени и миРНК на RAS мутационния статус на тумора според стадирането на пациентите.

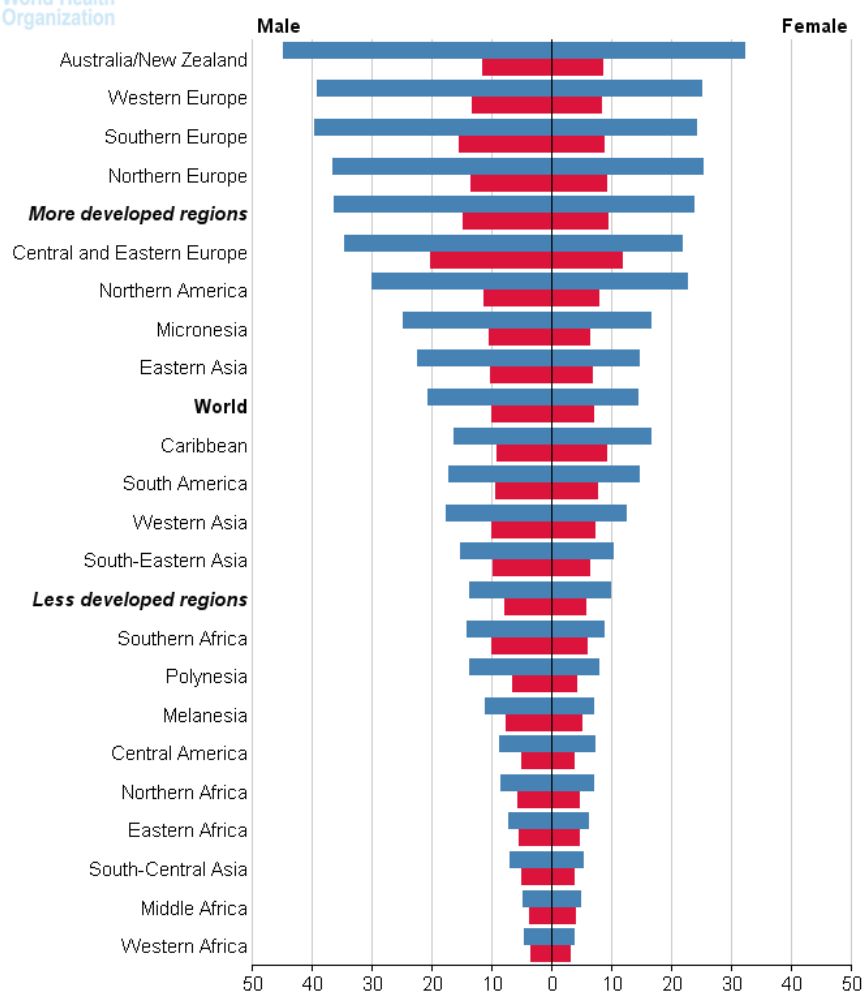
За да се доближим най-добре по реалния молекулярен статус, който се наблюдава в *in vivo* условия, ние избрахме да извършим анализите върху туморни тъкани от пациенти, подложени на хирургична интервенция, в последствие фиксирани във формалин и парафинизирани (FFPE). По-конкретно, анализирахме относителната експресия на споменатите гени и миРНК в сравнение със здравата тъкан от дебело черво, получена от линиите на резекция на хирургично резектираните проби. Ограниченията, възникващи при работа с такива проби, бяха преодоляни чрез модификации и подобрения в работния процес на лабораторните протоколи.

Колоректален карцином

Колоректалният рак (КРК) е хетерогенно заболяване, причинено от взаимодействието на генетични и фактори на околната среда. Съгласно тези фактори и според молекулярния фон на всеки отделен КРК, КРК може да бъде добре класифициран. Смята се, че около 20%-25% от случаите имат свързан наследствен компонент, който все още не е добре установен и е известен като фамилен КРК (1,3).

Епидемиология

Колоректалният рак е третият по честота на срещане рак при мъжете (746 000 случая, 10,0% от общия брой) и вторият - при жените (614 000 случая, 9,2% от общия брой) в целия свят (Фигура 1).

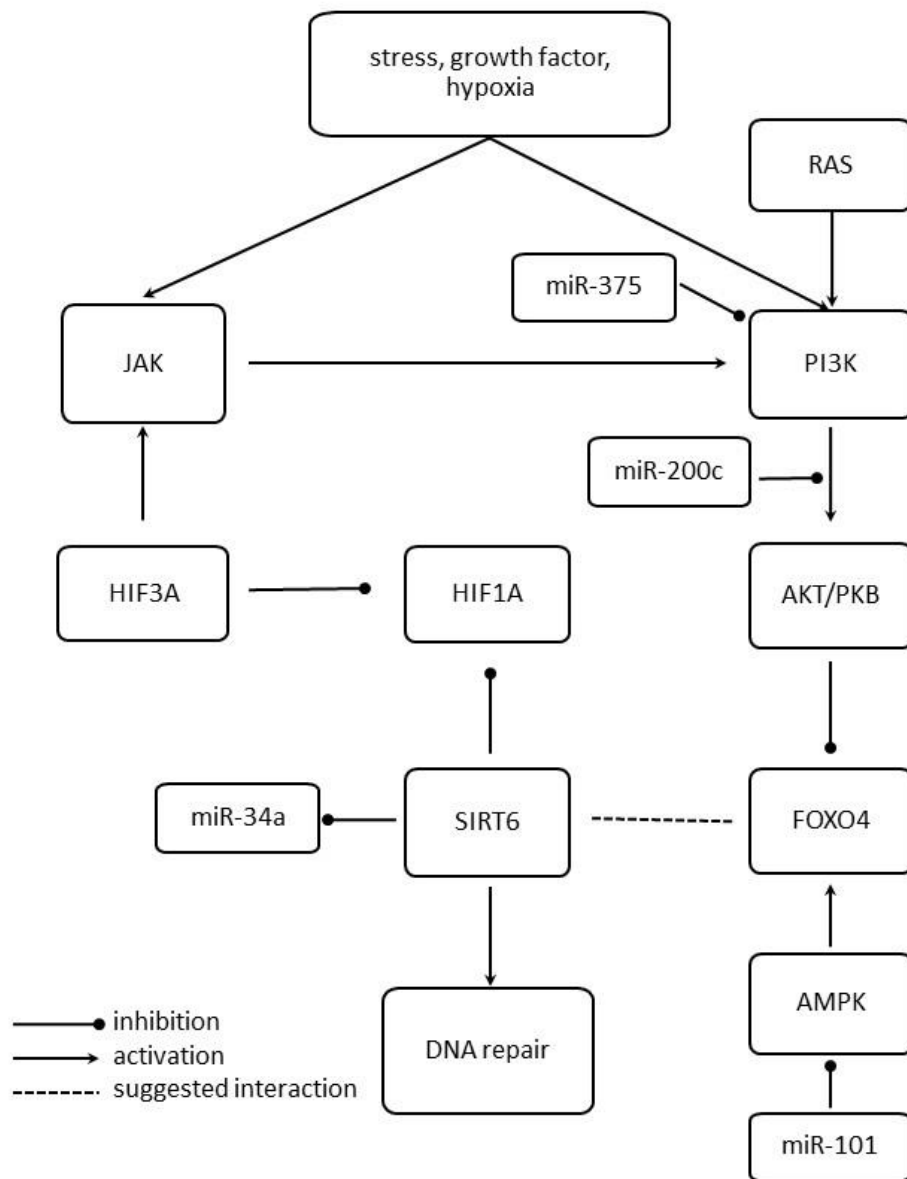


GLOBOCAN 2012 (IARC)

■ Incidence
■ Mortality

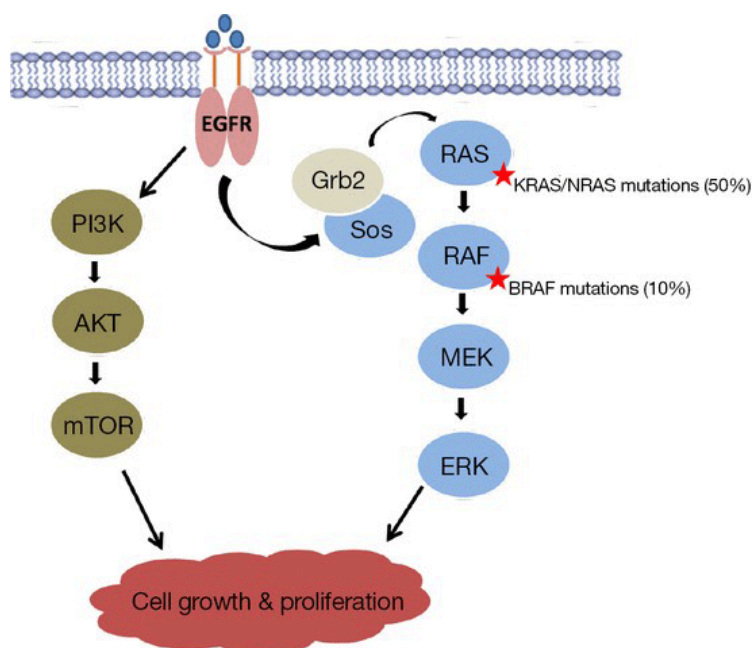
Фигура 1. Прогнозирани нива, стандартизирани по възраст (свят) на 100 000 (13).

Механизмите на взаимодействие между SIRT6, FOXO4, HIF3A, miR-134, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375



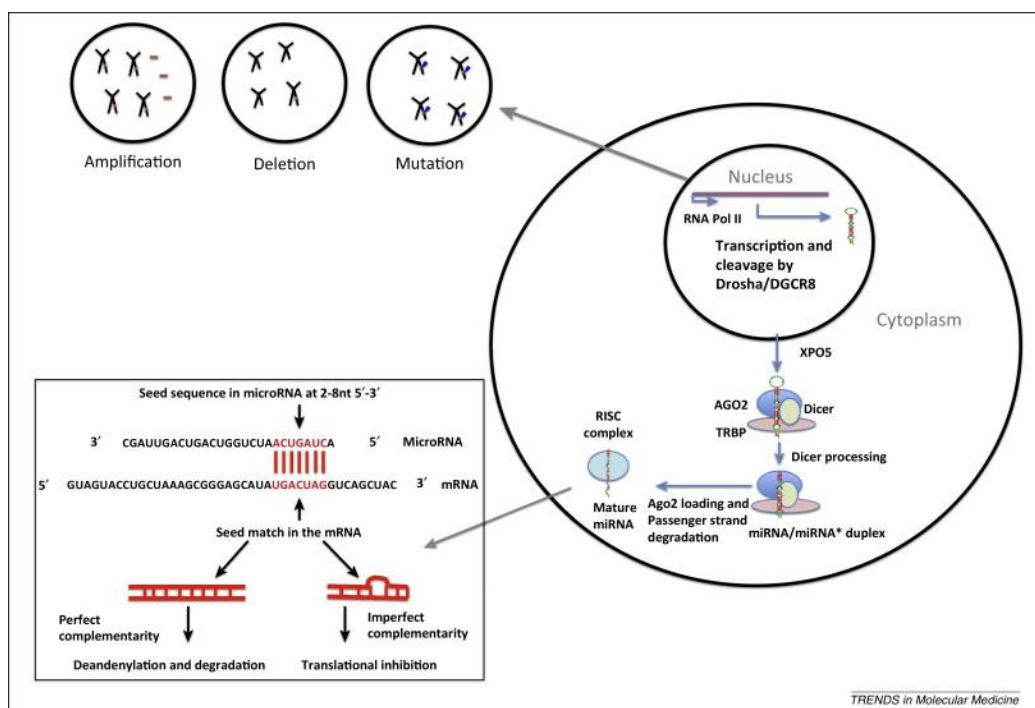
Фигура 2. Схематично представяне на механизмите на взаимодействие между SIRT6, FOXO4, HIF3A, miR-134, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375.

KRAS/NRAS сигнализираща каскада



Фигура 3. RAS и PI3K / AKT сигнализираща каскада при колоректален рак (76).

Роля на микроРНК-ите при раковите заболявания



Фигура 4. Схематично представяне на синтеза и функцията на миРНК (97).

Цел и задачи

Цел

Целта на настоящото изследване е да се анализира мутационният статус на RAS онкоген, във връзка с експресионните нива на гени от значение за енергийния метаболизъм, хипоксия и геномна стабилност, както и на някои микроРНК с роля в регулацията при същите сигнали пътища при колоректални тумори.

Задачи

1. Анализ на RAS мутационния статус, профил и стадирането на пациенти с КРК.
2. Анализ на нивата на експресия на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гените в туморна тъкан на пациентите с колоректален карцином в сравнение с експресионния профил при здрава тъкан на дебело черво и корелация с RAS мутационния статус и стадирането на пациентите.
3. Корелация между експресията на гените SIRT6, FOXO4 и HIF3A при пациентите с колоректален карцином, според RAS мутационния статус и стадирането на пациентите.
4. Анализ на нивата на експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 микроРНК на всички тумори на пациентите в сравнение със здравата тъкан на дебелото черво и корелация според RAS мутационния статус и стадирането на пациентите.
5. Корелация между гени SIRT6, FOXO4, HIF3A и miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 микроРНК при пациентите с колоректален карцином, според RAS мутационния статус и стадирането на пациентите.

Материали и методи

Материали

Подбор на пациенти

Изборът на пациенти беше извършен чрез идентифициране на пациенти с колоректален рак, диагностицирани и лекувани в университетската болница УМБАЛ "Св. Марина" Медицински университет - Варна. Проучването беше ретроспективно. Използвани бяха биопсични проби от туморни и здрави тъкани на пациенти, съхранявани като парафинови блокчета и срези при подходящи условия в Клиниката по „Обща и клинична патология“ - УМБАЛ „Света Марина“ – Варна. Общият брой пациенти, включени в проучването, е 42. Молекулярна диагностика за откриване на мутации на RAS и експресионния анализ на протеин кодиращи и мРНК гени беше извършен с използване на тъканни проби от FFPE от всеки от изследваните пациенти. Разрешение от Комисията по Етика (КЕНИ) удостовери възможността за използване на биопсичните проби с протокол / решение No 55 от 16.06.16г.

Пробовземане и подготовка на тъканта

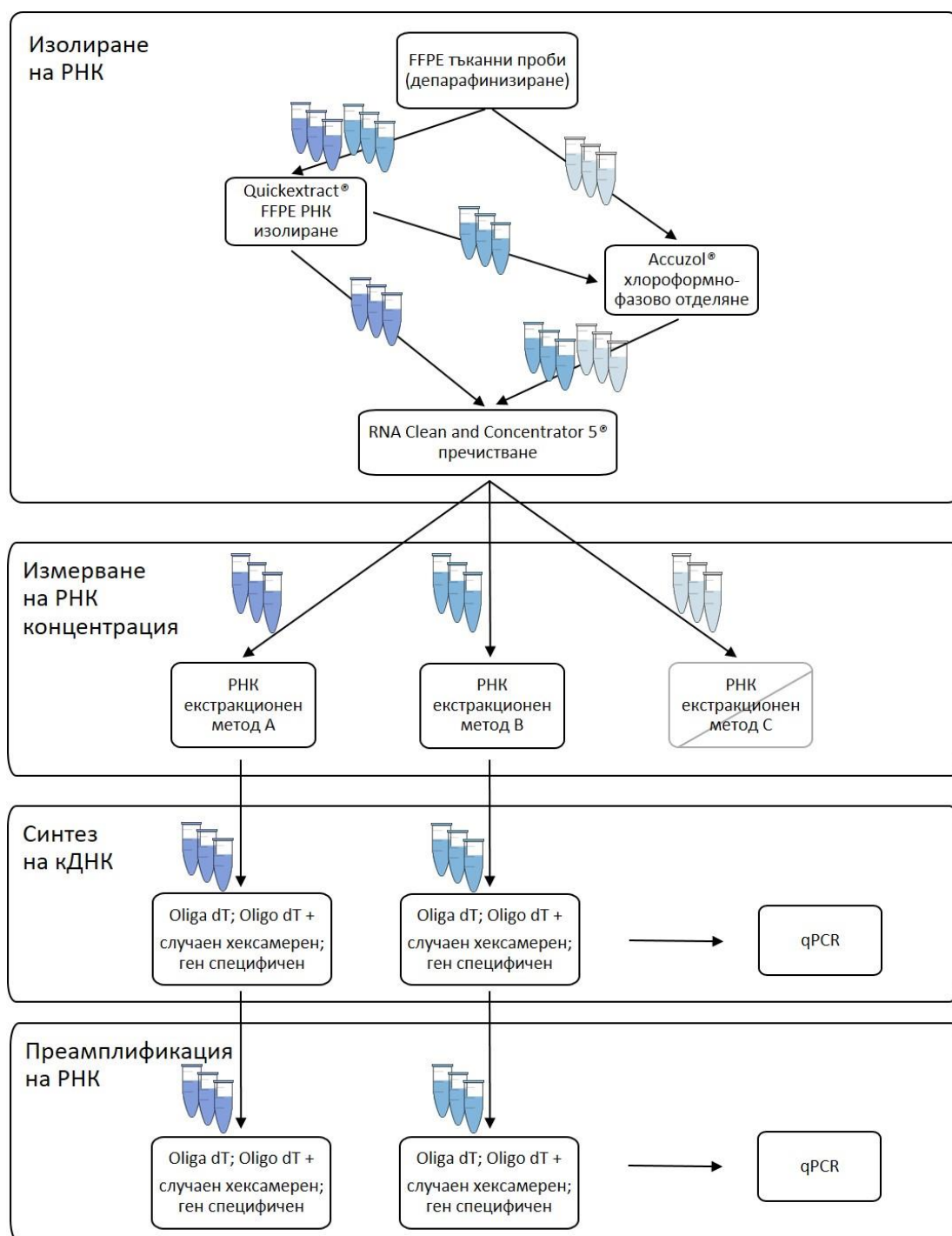
Няколко части от хирургично изрязаната при планирано хирургично лечение на пациенти диагностицирани с КРК човешка тъкан се потапят незабавно в 10% буфериран неутрален формалинов разтвор и остават в разтвора 24 часа, преди да бъдат обработени и ръчно поставени в парафин, съгласно стандартен университетски протокол (УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, България). Тъканните срези от FFPE а се съхраняват при 4 ° C и се обработват непосредствено след получаването им в Лабораторията по „Нутригеномика, функционални храни и нутрицевтици“ на Катедрата по „Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика“ при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Методи

Приготвяне на FFPE тъканни срези

Серийни тъканни срези бяха вземани с помощта на микротом (LEICA RM2235, Германия) в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при УМБАЛ „Св. Марина“, МУ-Варна.

Оптимизиране на протоколите за молекулен анализ. Ход на работа



Фигура 5. Ход на експерименталната работа и сравнение на комбинирани методи за изолиране на РНК, кДНК синтез и преамплифициране на получената кДНК матрица

Екстракция на РНК

Като първа стъпка бе извършено депарифинизиране и се следва протокола оказан по-долу в Секция „Депарифинизиране“.

Метод А с използването на Лизис буфер

Тъканните проби бяха обработени с по 100 µl Quickextract FFPE РНК екстрахиращ лизиращ буфер (Epicerter, Illumina, USA) и се следва протокола оказан по-долу в Секция „РНК екстракция“, без да се прави фенолна екстракция.

Метод Б – комбинирано използване на Лизис буфер и фенолна екстракция

Тъканните проби бяха обработени с лизисен буфер по същия начин, както протокол А. Непосредствено след завършване на крайното инкубиране се прибавя 1 mL студен разтвор на Accuzol (Bioneer, Република Корея) за охлаждане на пробите и се следва стандартната процедурата за РНК екстракция.

Метод В – фенолна екстракция

1 mL Accuzol (Bioneer, USA) се добавя директно към пробите от депарафинизирана тъкан. Процесът следва процедурата, която е описана в Секция „РНК екстракция“. Екстрахираната РНК се пречиства чрез центробежни колони RNA Clean и Concentrator 5 (Zymo Research, USA).

Синтез на кДНК

За синтеза на кДНК матрици се добавят 500 ng тотална РНК и вода до краен обем от 10 µl. За всяка проба се провеждат три вида реакции, като се използва 1 µl oligodT праймер, 1 µl oligodT плюс 1 µl случайен хексамерен праймер и 15 pmol ген-специфичен обратен праймер (RPL37a) (Таблица 1) и се следва протокола, оказан от производителя (Секция „Синтез на кДНК“).

кДНА преамплифициране

Пробите бяха преамплифицирани в стандартна 50 µl обемна PCR реакция за всяка проба. За всяка реакция се използва матрица кДНК с обем от 5 µl за 5 цикъла.

Таблица 1. Секвенция на праймер за транскрипта на рибозомален протеин L37A.

Primers	Forward	Reverse
RPL37A 94bp	ATTGAAATCAGCCAGCACGC	AGGAACCACAGTGCCAGATCC

Количествен PCR анализ

Резултатите се потвърждават чрез qPCR. Температура на анилинг и елонгация на RPL37A гена е при 63°C, Секция „Количествен PCR анализ“.

Откриване на KRAS/NRAS мутации

За откриване на мутация в KRAS / NRAS при пациенти с КРК, са използвани секционни участъци от FFPE тъканна проба след хирургична резекция на туморни маси и поставяне на хистологична диагноза. Тъканните проби се депарифинизират и се подлагат на ДНК екстракция и пречистване, като се използва QIAamp ДНК FFPE Tissue Kit (Qiagen, USA). Изолираната ДНК се използва като матрица за откриване на мутации, използвайки AmoyDx® KRAS /

NRAS Mutations Detection Kit (Amoy Diagnostics Co., China). Молекулярната диагностика се осъществява чрез Real time PCR и се извършва рутинно в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, Факултет по фармация, Медицински университет - Варна.

Депарафинизиране

Депарифинизиране на тъканните срези бе направено с ксилен и етанол следвайки стандартната процедура.

РНК екстракция

Към сухата депарафинизирана тъкан беше добавено 100 µl от QuickExtract FFPE РНК екстрахиращ лизисен буфер (Epicenter, Illumina, USA) и 1мл разтвор Accuzol (Bioneer, Република Корея). Пробите се прехвърлят за пречистване и концентриране в RNA Clean и Concentrator 5 spin колонки (Zymo Research, САЩ).

РНК добив и чистота

Концентрацията и чистотата на изолираната РНК се изчисляват за всяка проба. Абсорбцията се измерва при 260 nm, 280 nm и 320 nm спектрофотометрично, като се използва плака Take3 на Synergy 2 инструмент (Biotek, USA). Всяка проба се измерва два пъти.

Пречистване на РНК чрез третиране с ДНКаза

За отстраняването на остатъчното количество от геномна ДНК се провежда реакция на ДНК-азно третиране следвайки указанията на производителя (Epicenter, Illumina, USA). Съгласно нашия опит ДНКаза I не успява да разгради напълно малките остатъци от геномни ДНК фрагменти в силно концентрирани проби, което може да доведе до фалшиви резултати по време на qPCR амплификацията, предвид на това, че препоръчаните размери на амплификационните предукти е добре да бъдат по-малки от 100 bp.

Синтез на кДНК за генна експресия

За синтеза на кДНК се използва 500 ng тотална РНК матрица и вода се смесват до краен обем от 10 µl. 1 µl, съдържащ 15 pmol ген специфичен обратен праймер (Таблица 2). Пробите се изработват на апарат GeneAmp PCR System 9700 с термо блок (Applied Biosystems, USA).

Преамплифициране на кДНК за генна експресия

Пробите бяха преамплифицирани до крайни обеми от 25 µl на PCR реакция за всяка проба. За една реакция беше използвана матрична кДНК с обем от 5 µl. Пробите се амплифицират в термо блок GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA).

Таблица 2. Секвенции на праймери за SIRT6, FOXO4, HIF3A, RPL37A

Primers	Forward	Reverse	Primer bank ID
SIRT6-194bp	CCCACGGAGTCTGGACCAT	CTCTGCCAGTTTGTCCCTG	300797596c1
FOXO4-113bp	CCGGAGAAGCGACTGACAC	CGGATCGAGTTCTTCCATCCTG	283436081c2
HIF3A-156bp	GGAAGGTGTCTCTGTGTTTC	CCTCGTTGTGCTCAATGCAG	326807023c2
RPL37A-94bp	ATTGAAATCAGCCAGCACGC	AGGAACCACAGTGCCAGATCC	-

Синтез на кДНК за експресия на миРНК

За синтеза на кДНК се използва 300 ng тотална РНК матрица и вода се добавят до краен обем от 20 µl. От всеки Stem-loop праймер по 50 nM и 10 pmol обратен праймер за U6 (Таблица 3). Пробите се изработват на апарат GeneAmp PCR System 9700 с термо блок (Applied Biosystems, USA).

Преамплификация на кДНК за експресия на миРНК

Пробите бяха преамплифицирани до крайни обеми от 25 µl за PCR реакцията за всяка проба. За една реакция се използва матрична кДНК с обем от 5 µl. Пробите се амплифицират в термо блок GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Първоначалното денатуриране се извършва при 95°C в продължение на 5 минути, последвано от 95°C в продължение на 15 секунди и 60°C в продължение на 4 минути за 5 цикъла. Пробите се охлаждат до 4°C и се съхраняват при -20°C.

Таблица 3. Секвенция на miRNAs праймерите и праймери за U6

Primers	Forward	Stem Loop
miR-143	ACACTCCAGCTGGGTGAGATGAAGCACTG	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGAGCTACA
miR-200c	ACACTCCAGCTGGGTAATATGTGCCGGGTAAT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCCATCAT
miR-101	ACACTCCAGCTGGGTACAGTACTGTGATA	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTTCAGTTA
miR-34b	ACACTCCAGCTGGGCAATCACTAACTCCAC	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATGGCAGT
miR-375	ACACTCCAGCTGGGTTTGTTCTGTTTCGGCTC	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCACGCGA
Universal reverse	GTCGGCAATTCAGTTGAG	
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT(Forward)	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT(Reverse)

Количествен PCR анализ

Пробите бяха анализирани с помощта на количествен PCR в реално време с апарат ABI7500 Real-time PCR.

Статистически анализ

Данните се изразяват като средна стойност \pm стандартна грешка (SE) или \pm стандартно отклонение (SD). Статистическата значимост е определена при 95% доверителен интервал (CI) с използване на Two-tailed чифтен Student *t*-тест и one/two - way ANOVA. Статистическото значение е определено като * за стойност на $p < 0.05$, ** за стойност на $p < 0.01$ и *** за стойност на $p < 0.001$. Анализът на корелацията беше извършен чрез изчисляване на непараметричния корелационен коефициент Spearman *r*, тъй като пробата не следва Gaussian разпределение. За силна корелация се отчитат стойности, когато са $0,8 \pm \leq r \leq \pm 1$, умерена корелация, когато са $0,3 \pm \leq r \leq \pm 0,9$ и слаба корелация, когато $r \leq \pm 0,3$. Всички представени данни са обработени с помощта на Microsoft Excel 2013 и Graphpad Prism V6 софтуер.

Резултати

Оптимизиране на протокола за молекулен анализ – добив и чистота на РНК, количествен RT-PCR

Сравнение на РНК добив и чистота при различни екстракционни методи

Нуждата от оптимизиране на изолационните техники на генетичния материал, за да се постигнат най-високи добиви, поради ограниченото количество фиксирана тъкан за все по-нарастващите възможности в молекулярната биология, като RT-qPCR (128), microarrays (129), секвениране от следващо поколение (130) и профилиране на метилиране от FFPE (131). Анализът за определяне концентрацията на РНК показва ясно, че комбинацията от лизиращ буфер с екстракция с фенол-хлороформ има преимущество пред другите методи (методи А и С) (Таблица 4). Използването само на лизиращия буфер води до значително по-нисък добив, а екстракцията с фенол-хлороформ - до изключително нисък добив и чистота. Следователно, последният не отговаря на необходимите критерии, за да бъде включен в последващите експресионни анализи и затова бе изключен от допълнителни анализи в нашето изследване.

Таблица 4. Сравнение на количеството и чистотата на РНК, изолирана чрез използване на три различни метода на екстракция.

Метод	РНК концентрация [ng/μl]	РНК добив [ng]	A _{260/280}	p value
A	163,36 ± 17,96 ***	2450.40 ± 269.43	2,03 ± 0,07	0.00014
B	259,87 ± 38,60 #	3898.00 ± 579.02	2,02 ± 0,02	0.01716
C	15,51 ± 2,06 \$\$\$	232,60 ± 30.90	1,83 ± 0,21	0.00040

Данните са представени като средни стойности ± SD от три еднакви FFPE тъканни проби. *** $p < 0.001$ vs. C, # $p < 0.01$ vs. A, \$\$\$ $p < 0.01$ vs. B.

Легенда: А - екстракция на РНК с лизиращ буфер, В – използване на лизиращ буфер и фенол за екстракция на РНК, С – фенолна екстракция на РНК.

Количествен RT-qPCR

Ефективността на екстракцията с методи А и В беше анализирана чрез количествен RT-PCR. Бе установено, че когато при синтезата на кДНК се използват ген-специфични праймери, Ct показват много по-ниски стойности и за двата метода в сравнение с методиката, при която се използва oligodT и комбинацията от oligodT и случайни хексамерни праймери, както за непреамплифицирана (табл. 5), така и за преамплифицирана матрица (Таблица 6). Анализът на кривата на топене на продуктите, получени при използването на ген-специфични праймери за синтез на кДНК, демонстрира ясни пикове за всички повторения за двата метода А и В, докато при реакциите при останалите две стратегии за синтез на кДНК нямаше добри и ясни криви на топене.

Таблица 5. Сравнение на Ct стойностите, получени чрез двустъпков qPCR при използване на непреамплифицирани кДНК проби.

Непреамплифицирани				
	Ct A	Ct B	ΔCt (Ct _B -Ct _A)	p value
oligodT	27.93 ± 0.69	31.50 ± 0.46	3.57**	0.0017
oligodT+ случайни хексамери	26.40 ± 0.62	27.26 ± 0.60	0.86	0.1611

ген специфичен обратен праймер	20.20 ± 0.53	20.89 ± 0.46	0.69	0.1622
--------------------------------	---------------------	---------------------	------	--------

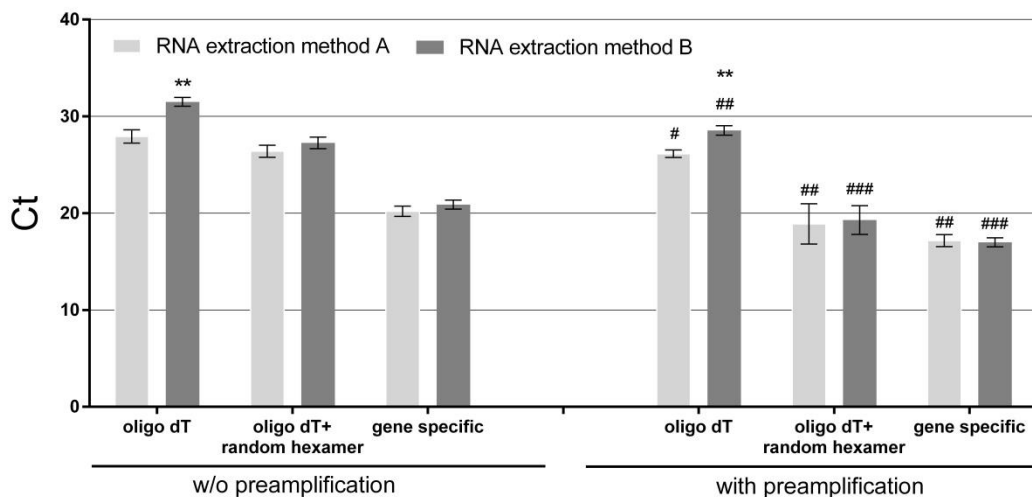
Данните се представят като средни стойности ± SD на тъканни проби от FFPE и за двата метода, използващи три различни стратегии за обратна транскрипция (oligodT, oligodT + случайни хексамери и ген специфичен обратен праймер), на непреамплифицирани кДНК матрици. ** p <0.01 РНК екстракция метод А спрямо Б. Легенда: А - РНК екстракция с лизиращ буфер; В - РНК екстракция при използването на лизиращ буфер и фенол.

Таблица 6. Сравнение на Ct стойностите, получени чрез двустъпков qPCR при използване на преамплифицирани кДНК проби.

Преамплификация				
	Ct A	Ct B	ΔCt (Ct _B -Ct _A)	p value
oligodT	26.14 ± 0.39	28.54 ± 0.49	2.41**	0.0026
oligodT+случаен хексамерен праймер	18.89 ± 2.09	19.29 ± 1.49	0.41	0.7971
Ген специфичен праймер	17.17 ± 0.62	16.99 ± 0.46	0.18	0.7132

Данните се представят като средни стойности ± SD на FFPE тъканни проби и за двата метода, използващи три различни стратегии за провеждане на обратната транскрипция (олигодТ, олигодТ + произволен хексамер и ген специфичен обратния праймер), на преамплифицирани кДНК матрици. ** p <0.01 РНК екстракция метод А спрямо Б. Легенда: А - РНК екстракция с лизиращ буфер; В - РНК екстракция при използването на лизиращ буфер и фенол.

При сравняване на oligodT стратегията за синтез на кДНК между методите А и В се установява статистически значима по-висока ефективност за количеството на РНК, екстрахирана по метод А, отколкото по В, върху непреамплифицирани (p = 0.001) и преамплифицирани матрици (p = 0.002). Това може да се дължи на способността на лизиращия буфер да извлича в по-високо съотношение интактни РНК копия отколкото фрагментирани къси РНК в сравнение с комбинирана екстракция с фенол базиран буфер (144).

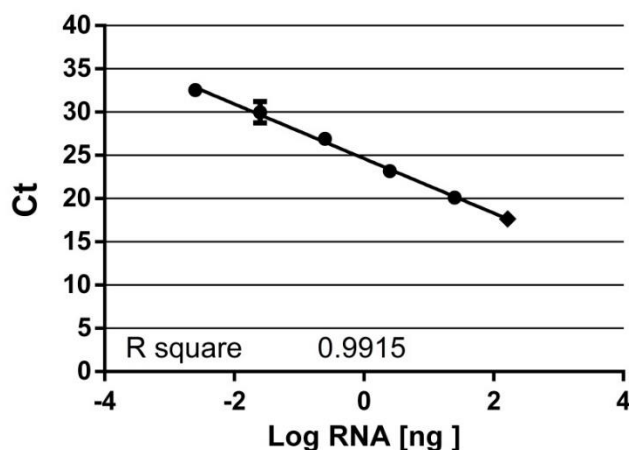


Фигура 6. Сравнение на Ct стойностите, получени чрез двустъпков qPCR при използване на непреамплифицирани и преамплифицирани кДНК проби. Данните се представят като средни стойности \pm SD от FFPE тъканни проби за двата метода на екстракция на РНК, като се използват три различни стратегии за обратна транскрипция (oligo dT; oligo dT + случаен хексамер; ген специфичен обратен праймер). ** $p < 0.01$ спрямо РНК екстрахиращ метод А; $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ спрямо съответната стратегия за синтез на кДНК и RNA екстрахиращ метод без преамплификация. Легенда: А -РНК екстракция с лизиращ буфер (сиво); В – екстракция на РНК при използване на лизиращ буфер и фенол (тъмно сиво).

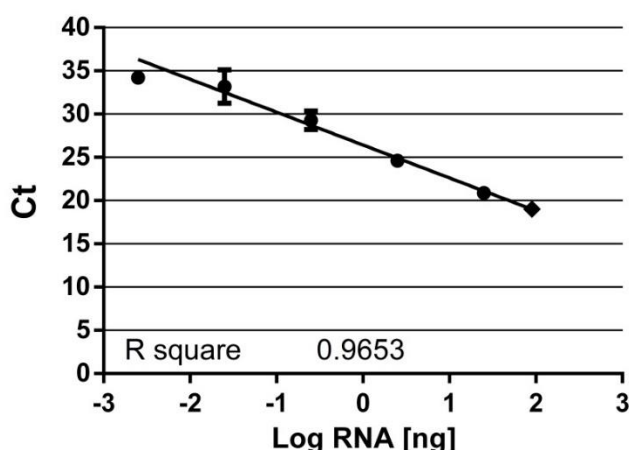
При анализа на Δ Ct средните стойности между матриците получени от метод А и метод В за синтезиране на кДНК с използване на oligo dT + случаен хексамерен праймер, забелязахме, че няма статистически значима разлика при непреамплифицирани ($p = 0,161$) и преамплифицирани матрици ($p = 0,797$). По подобен начин за синтезиране на кДНК с използване на ген- специфични праймери не открихме статистически значима разлика при непреамплифицирани ($p = 0,162$) и преамплифицирани матрици ($p = 0,713$). Сравнявайки стойностите на Δ Ct между непреамплифицирани и преамплифицирани матрици за трите 3 стратегии, бе оценена ефикасността на преамплификацията. Забелязваме статистически значимо подобрение както за метода А ($p < 0.0001$), така и за В ($p < 0.0001$) (Фигура 6). Стойността Δ Ct за oligo dT и ген специфичните кДНК матрици е 2.37 ± 0.82 и 3.46 ± 0.61 , респективно. Това е близко до очакваната стойност, като се взема предвид разреждането на кДНК матрица (10x), използвано за преамплификацията, и пренесено в qPCR. От друга страна, кДНК матрицата, получена при обратна транскрипция с oligo dT и случаен хексамерен праймер, имаше Δ Ct стойност 7.74 ± 0.32 , което съответства на по-висока ефективност от очакваното, като по този начин се компрометира валидността на анализа. Поради това се прави заключението, че за да се оцени ефективността на преамплификацията, е необходимо абсолютно количествено определяне на ефективността на преамплификацията.

Относителна стандартна крива

Чрез извършване на абсолютно количествено определяне е създадена стандартна крива за оценяване на ефикасността на преамплификацията с използване на ген-специфични праймери за синтез на кДНК, с използване на РНК матрица, изолирана по метод А (фигура 7А) и по метод В (фигура 7В). За стандартизирането се използва серийно десетично разреждане на преамплифицираната кДНК. Чрез изчисляване на началната концентрация на матрицата преди преамплификацията ($C = 2.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) и при изследването на същия обем на матрицата от преамплифицирания продукт, ние получихме, ΔC_t стойност от 5.5 за метод А, съответстващ на 5.5 цикъла на преамплификация, въпреки че беше проведена преамплификация за 5 цикъла само. Подобно бе и за метод В, стойността ΔC_t отново бе 5.5. Това може да се дължи на грешки при пипетиране, намалена активност на ДНК полимеразата по време на размразяването на пробата, високи фактори на разреждане, въпреки че отклоненията от средните стойности са изключени (Lehmann and Kreipe 2001). Оценяване на ефективността на количественото определяне се потвърждава от високия r^2 резултат за методите А и В за изолиране на РНК, където $r^2 = 0.9915$ и $r^2 = 0.9653$, съответно.



А.

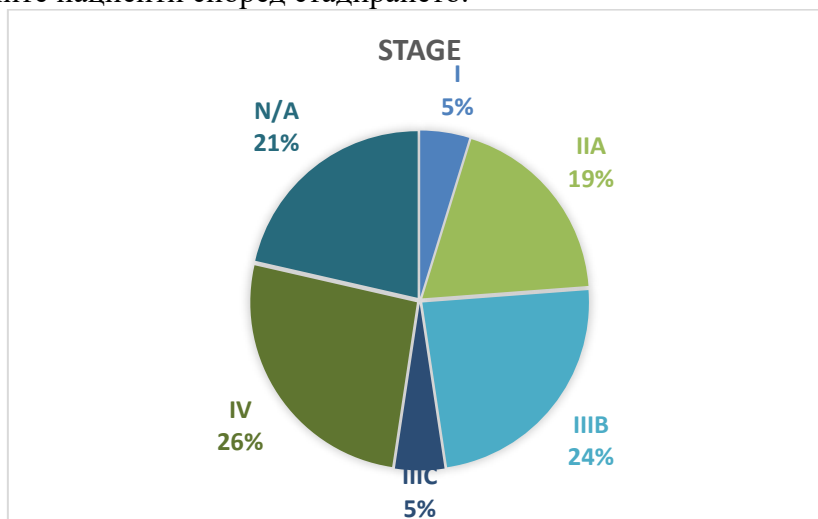


Б.

Фигура 7. Оценка на ефективността на преамплификация чрез относително количествено определяне на експресията на RPL37A за конструиране на стандартна крива на ген-специфична синтеза на кДНК при отчитане на стойността r^2 . А) метод на екстракция на РНК А; Б) Метод на екстракция на РНК В.

Стадиране на пациенти с КРК

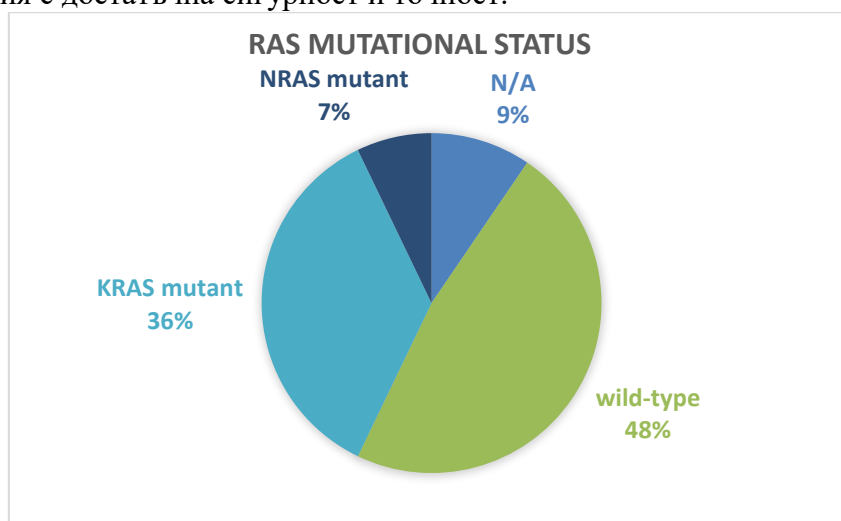
Стадирането на анализираниите пациенти е извършено в Катедрата по обща и оперативна хирургия и Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, УМБАЛ "Св. Марина", Медицински университет – Варна (Фигура 8). На фигура 8 е представено схематично разпределение на изследваните пациенти според стадирането.



Фигура 8. Схематично представяне на стадирането при пациентите като проценти.

RAS мутационен статус на пациентите с КРК

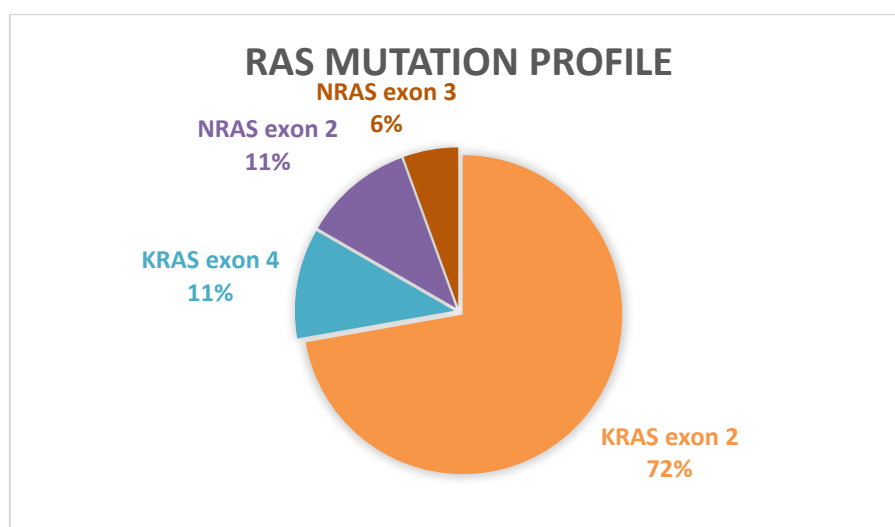
Ние анализирахме резултатите от молекулярната диагностика от 42 пациенти, диагностицирани с колоректален карцином за наличието на мутации в KRAS/NRAS гените и локализацията на мутацията в екзоните (Фигура 9, 10). Според анализа, 43% от колоректалните тумори носят мутация на RAS онкогена, а 48% не бе открита мутация. Резултатите от 4 (9% от всички) пациенти не дадоха категоричен резултат за потвърждаване на съществуването на мутация с достатъчна сигурност и точност.



Фигура 9. Схематично представяне на RAS див тип и KRAS/NRAS мутантни пациенти, изразени в проценти.

RAS мутационен профил на пациенти с КРК

Ние анализирахме резултатите от екзоните, където потенциално може да се съдържат мутации в KRAS / NRAS гените (Фигура 10). При по-голямата част (72%) от пациентите бе установена мутация на KRAS екзон 2. При 11% от пациентите, мутация бе установена в екзон 4 на KRAS, също и при 11% пациентите, мутация бе установена в екзон 2 на NRAS. А при 6% от всички анализирани пациенти с КРК тя бе локализирана в екзон 3 на NRAS.

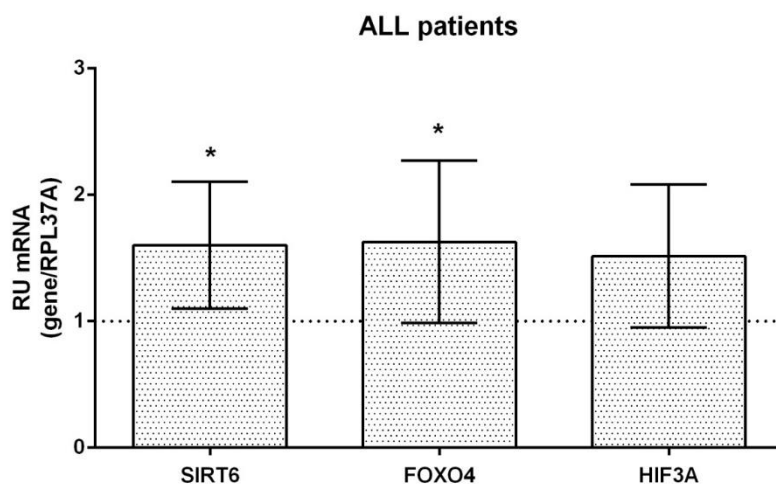


Фигура 10. Схематично представяне на KRAS / NRAS мутантния профил според локализация на мутацията в съответния екзон, изразено като проценти.

SIRT6, FOXO4, HIF3A експресия при пациенти с КРК

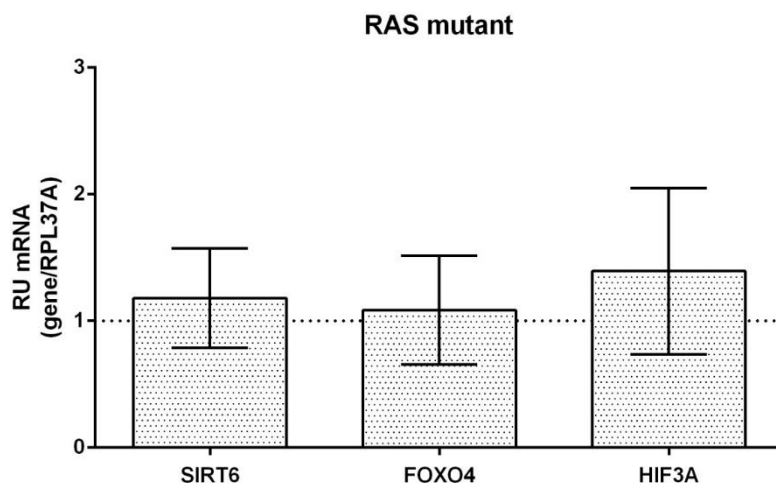
Сравнени бяха експресионните нива на SIRT6, FOXO4, HIF3A гени в туморите на колоректален карцином с тези в здрава съседна тъкан, получена от резекционните линии. Резултатите са отчетени за всички пациенти, съгласно RAS мутационния статус и според стадирането. Експресията бе измерена чрез qPCR и нормализирана спрямо RPL37 гена (Фигури 11-18).

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от всички пациенти с КРК се показват на фигура 11. Установена е повишена експресия на SIRT6, се намалени нива на експресия на FOXO4 и увеличена експресия на HIF3A.



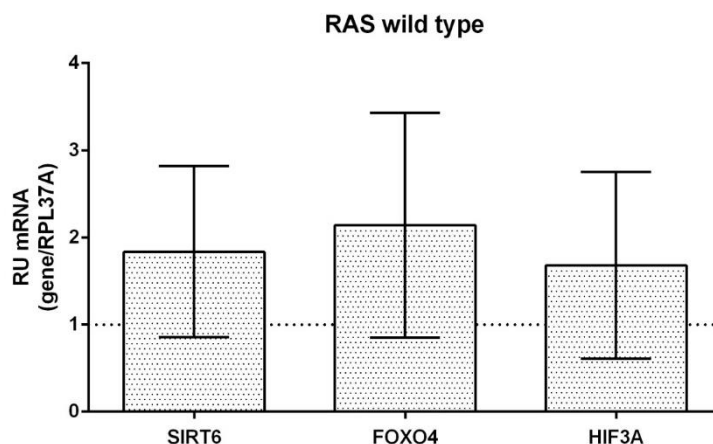
Фигура 11. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином във всички изследвани пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора. Статистическата значимост за SIRT6 и FOXO4 е $p = 0.038$ и $p = 0.031$, съответно.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от RAS мутантни тумори се показват на фигура 12. Експресията на SIRT6 при RAS мутантните е минимално увеличена, експресията на FOXO4 почти без промяна и сходно висока експресия на експресията на HIF3A.



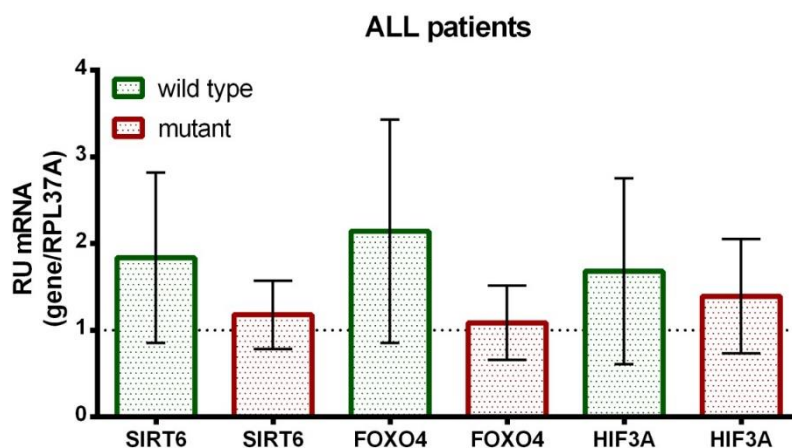
Фигура 12. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином в RAS мутантни тумори. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от RAS див тип тумори се показват на фигура 13. Експресията на SIRT6 в див тип RAS пациенти е повишена, както и експресията на FOXO4 и HIF3A.



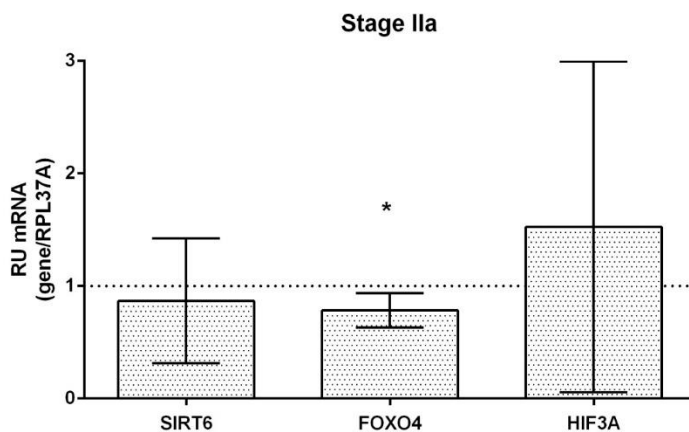
Фигура 13. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином в RAS див тип тумори. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от RAS мутантни и див тип тумори се показват на фигура 14. Експресията на SIRT6 в див тип RAS пациенти е приблизително два пъти по-висока, отколкото при RAS мутантните, FOXO4 с по-висока експресия при RAS див тип и почти никаква промяна в RAS мутантните и HIF3A със сходно висока експресия при RAS див тип и RAS мутантни.



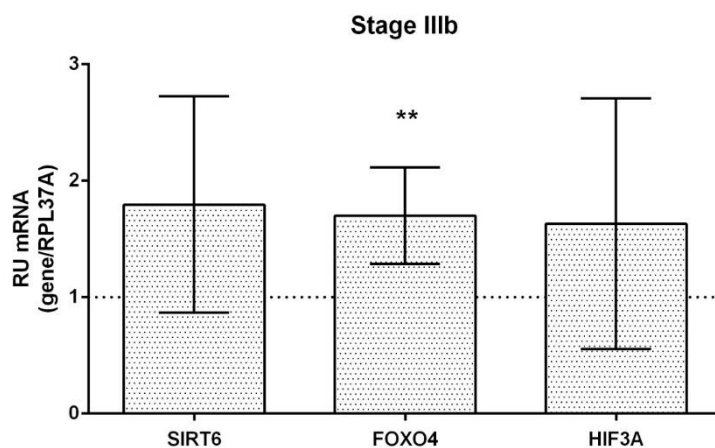
Фигура 14. Сравнение на относителната генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином в RAS мутантните и див тип тумори. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от IIa стадий пациенти се показват на фигура 15. При пациентите в IIa стадий експресията на SIRT6 е по-ниска, а експресията на FOXO4 е понижена. Експресия на HIF3A при пациенти от стадии IIa е повишена.



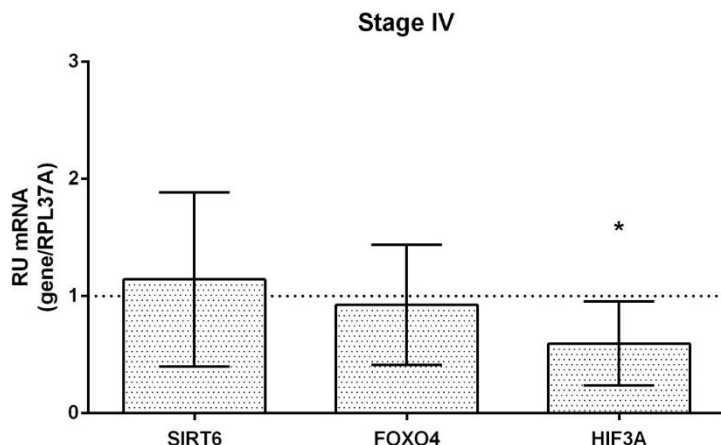
Фигура 15. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином при стадий IIa пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора. Статистическа значимост за FOXO4 е $p=0.015$.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от IIIb стадий пациенти се показват на фигура 16. При пациентите в IIIb стадий експресията на SIRT6 е по-висока, както и при FOXO4, експресията е значително повишена. Туморите от пациенти от стадии IIIb показват повишена експресия на HIF3A.



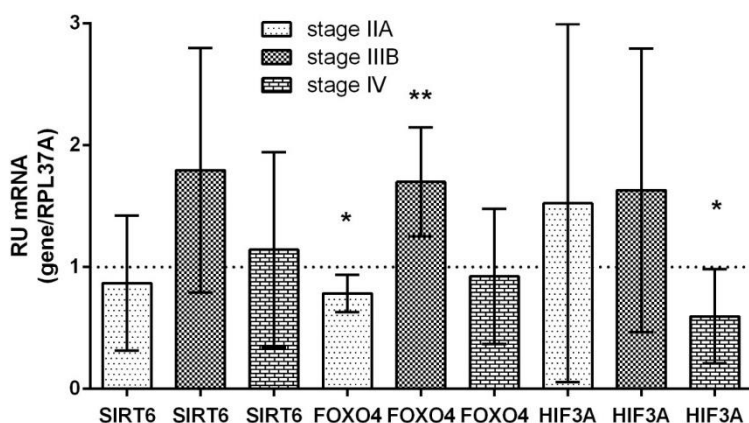
Фигура 16. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином при стадий IIIb пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора. Статистическа значимост за FOXO4 е $p=0.006$.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от IIIb стадий пациенти се показват на фигура 17. Експресията на SIRT6 и FOXO4 е минимално понижена при стадий IV, а експресията на HIF3A е значително понижена.



Фигура 17. Относителна генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином при стадий IV пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37A гена, който е използван като ендогенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора. Статистическа значимост за HIF3A е $p=0.032$.

Нивата на експресия на гените свързани с геномна стабилност, енергиен метаболизъм и хипоксия SIRT6, FOXO4 и HIF3A, респективно, от всички пациенти според стадирането се показват на фигура 18.

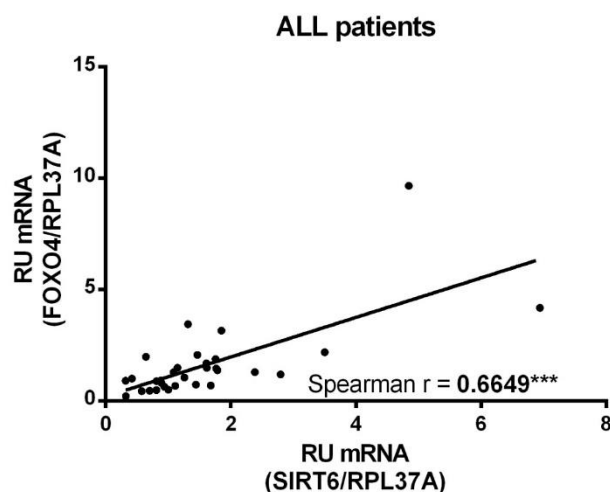


Фигура 18. Сравнение на относителната генна експресия на SIRT6, FOXO4, HIF3A от колоректален карцином при стадий IIa, IIb и IV пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу RPL37 гена, който е използван като ендогенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора. Статистическа значимост за FOXO4 при стадий IIa е $p=0.015$, за FOXO4 при стадий IIb е $p=0.006$ и за HIF3A при стадий IV е $p=0.032$.

Корелационен анализ на генните експресии на SIRT6, FOXO4, HIF3A

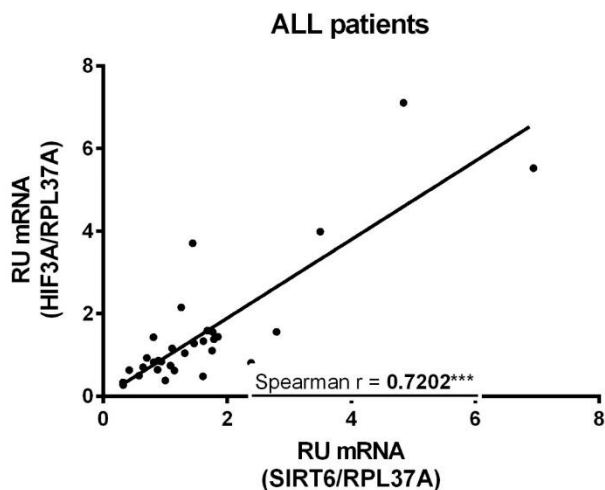
Беше анализирана корелацията между експресионните нива на SIRT6, FOXO4 и HIF3A по двойки за всички от анализираниите пациенти, според RAS мутационния статус и според стадирането. Анализът се извърши чрез изчисляване на непараметрична корелация на Spearman, тъй като кохортата на пациентите не следва Gaussian-ово разпределение. Коефициентът на корелация е показан на всяка фигура, заедно със степента на значимост за доверителен интервал 95%, където това е приложимо.

Нивата на експресия на SIRT6 са корелирани с тези на FOXO4 за всички пациенти (фигура 19). Установена бе средна корелация при изчисляване на корелационния коефициент $r = 0.6649$ с висока статистическа значимост $p < 0.0001$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



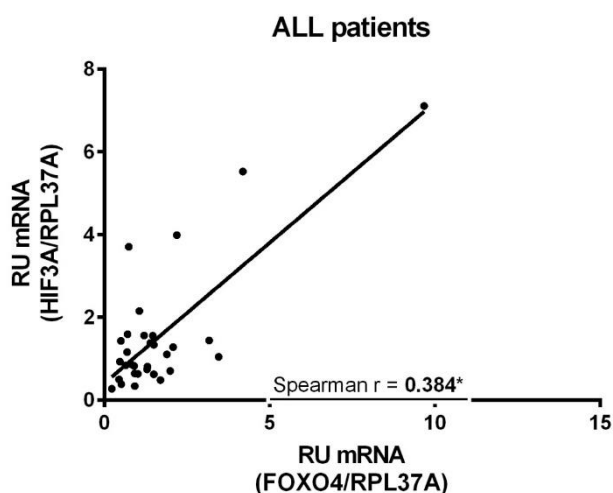
Фигура 19. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при всички изследвани пациенти. Spearman $r = 0.6649$ ($*** p < 0.0001$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за всички пациенти (фигура 20). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.7202$ с висока статистическа значимост $p < 0.0001$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



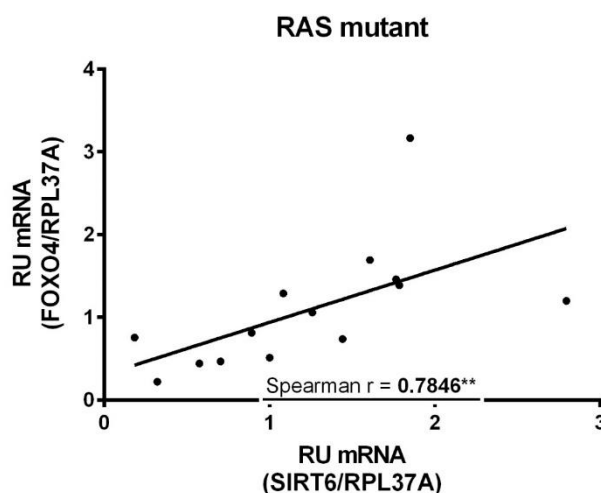
Фигура 20. Корелация на SIRT6 с HIF3A при всички изследвани пациенти. Spearman $r=0.7202$ (** $p < 0.0001$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за всички пациенти (фигура 21). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.384$ с статистическа значимост $p=0.0326$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



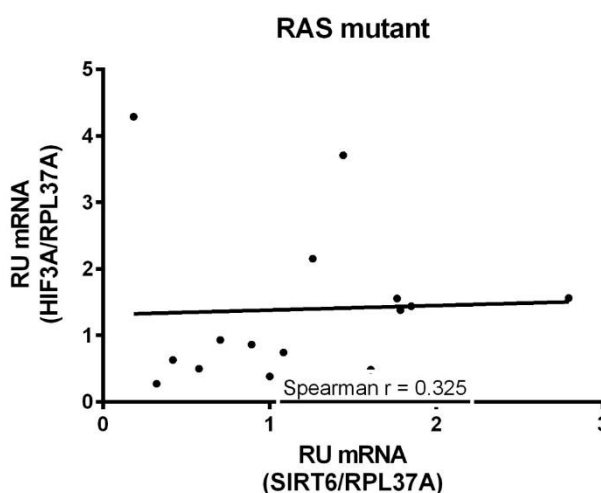
Фигура 21. Корелация на FOXO4 с HIF3A при всички изследвани пациенти. Spearman $r=0.384$ (* $p=0.0326$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на FOXO4 за RAS мутантни пациенти (фигура 22). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.7846$ с висока статистическа значимост $p=0.0014$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



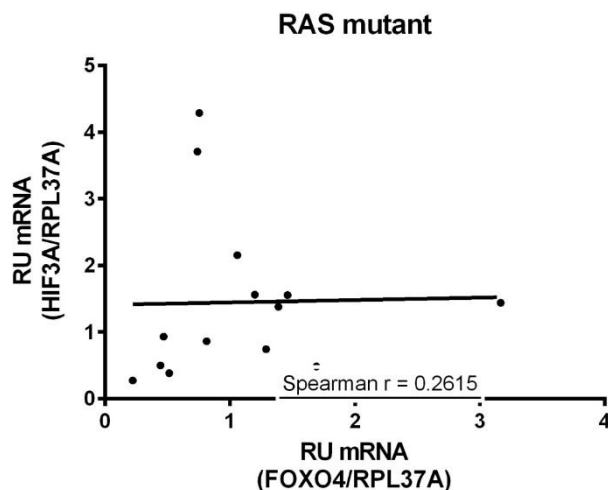
Фигура 22. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.7846$ (** $p=0.0014$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за RAS мутантни пациенти (фигура 23). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.325$ без статистическа значимост $p=0.2370$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



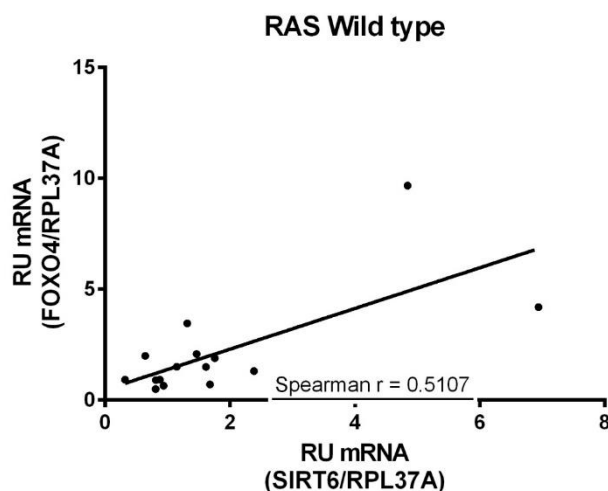
Фигура 23. Корелация на SIRT6 с HIF3A при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.325$ ($p=0.2370$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на FOXO4 бяха корелирани с тези на HIF3A за RAS мутантни пациенти (фигура 24). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.2615$ без статистическа значимост $p=0.3656$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



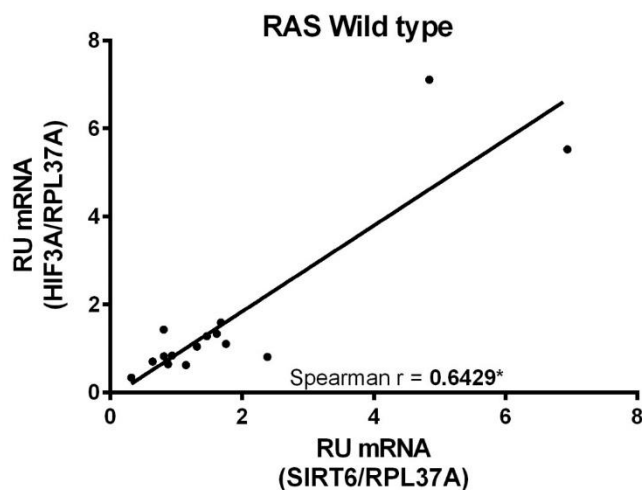
Фигура 24. Корелация на FOXO4 с HIF3A при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.2615$ ($p=0.3656$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на FOXO4 за RAS див тип пациенти (фигура 25). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.5107$ без статистическа значимост $p=0.0543$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



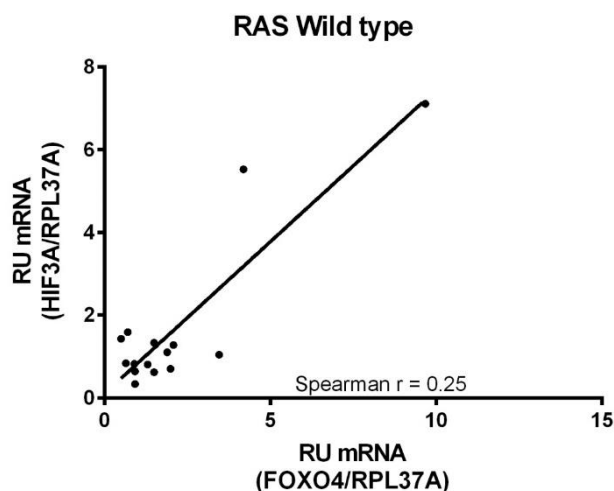
Фигура 25. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при RAS див тип пациенти. Spearman $r=0.5107$ ($p=0.0543$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за RAS див тип пациенти (фигура 26). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.6429$ със статистическа значимост $p=0.0116$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



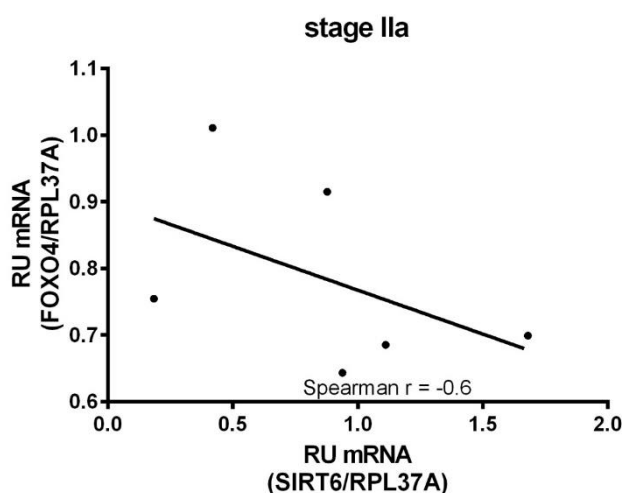
Фигура 26. Корелация на SIRT6 с HIF3A при RAS див тип пациенти. Spearman $r=0.6429$ ($*p=0.0116$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на FOXO4 бяха корелирани с тези на HIF3A за RAS див тип пациенти (фигура 27). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.25$ без статистическа значимост $p=0.367$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



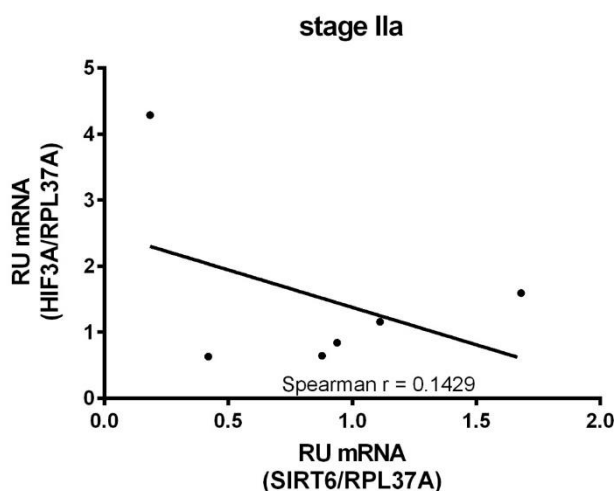
Фигура 27. Корелация на FOXO4 с HIF3A при RAS див тип пациенти. Spearman $r=0.25$ ($p=0.367$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на FOXO4 за стадий Па пациенти (фигура 28). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=-0.6$ без статистическа значимост $p=0.2417$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



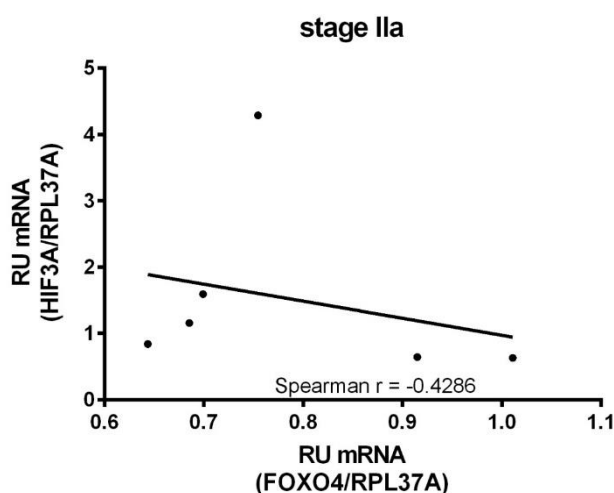
Фигура 28. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при стадий Па пациенти. Spearman $r=-0.6$ ($p=0.2417$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий Па пациенти (фигура 29). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.1429$ без статистическа значимост $p=0.8028$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



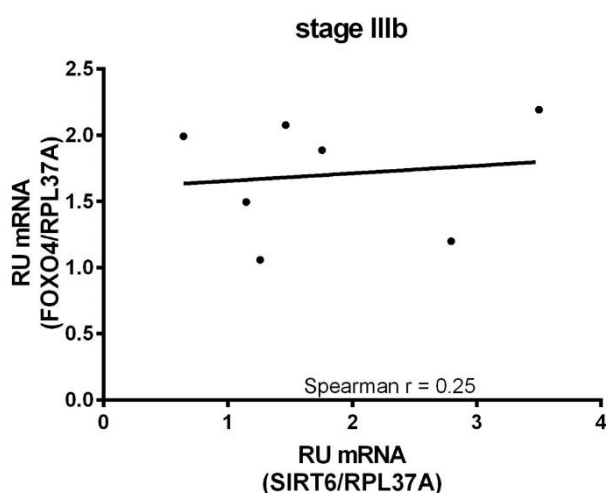
Фигура 29. Корелация на SIRT6 с HIF3A при стадий Па пациенти. Spearman $r=0.1429$ ($p=0.8028$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на FOXO4 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий Па пациенти (фигура 30). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=-0.4286$ без статистическа значимост $p=0.4194$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



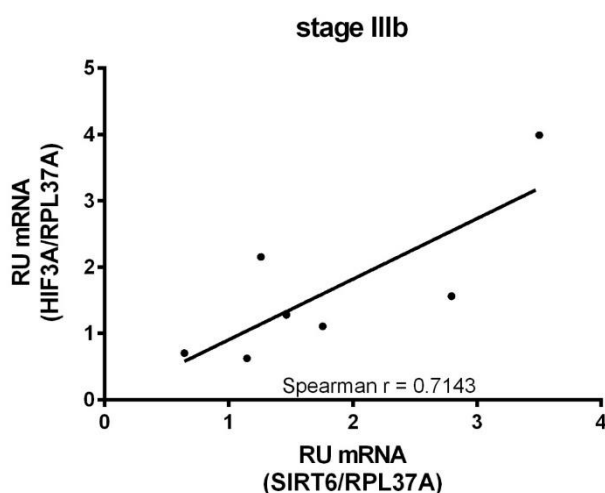
Фигура 30. Корелация на FOXO4 с HIF3A при стадий Па пациенти. Spearman $r=-0.4286$ ($p=0.4194$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на FOXO4 за стадий IIIb пациенти (фигура 31). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.25$ без статистическа значимост $p=0.5948$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендегенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



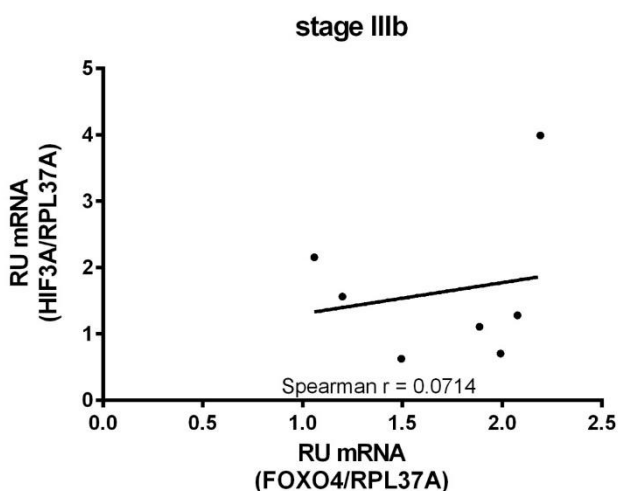
Фигура 31. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при стадий IIIb пациенти. Spearman $r=0.25$ ($p=0.5948$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий IIIb пациенти (фигура 32). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.7143$ без статистическа значимост $p=0.0881$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



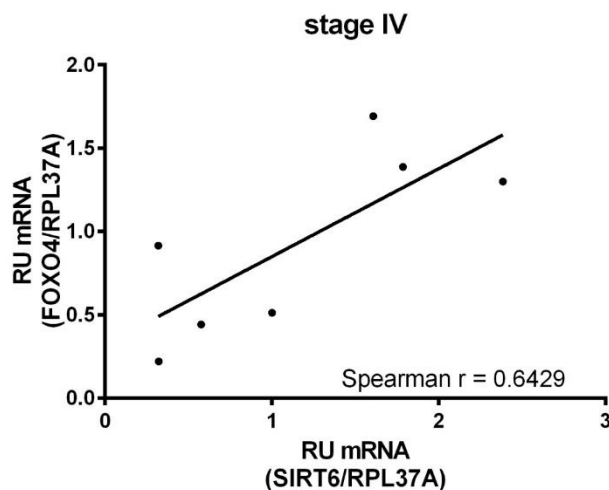
Фигура 32. Корелация на SIRT6 с HIF3A при стадий IIIb пациенти. Spearman $r=0.7143$ ($p=0.0881$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на FOXO4 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий IIIb пациенти (фигура 33). Установи се наличието на слаба корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.0714$ без статистическа значимост $p=0.9063$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



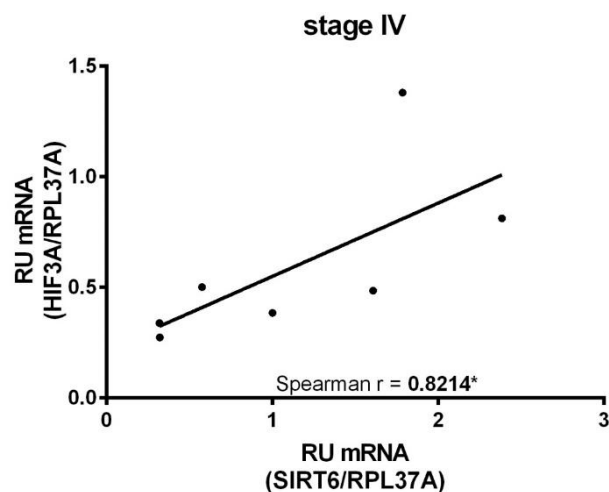
Фигура 33. Корелация на FOXO4 с HIF3A при стадий IIIb пациенти. Spearman $r=0.0714$ ($p=0.9063$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на FOXO4 за стадий IV пациенти (фигура 34). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.6429$ без статистическа значимост $p=0.1389$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



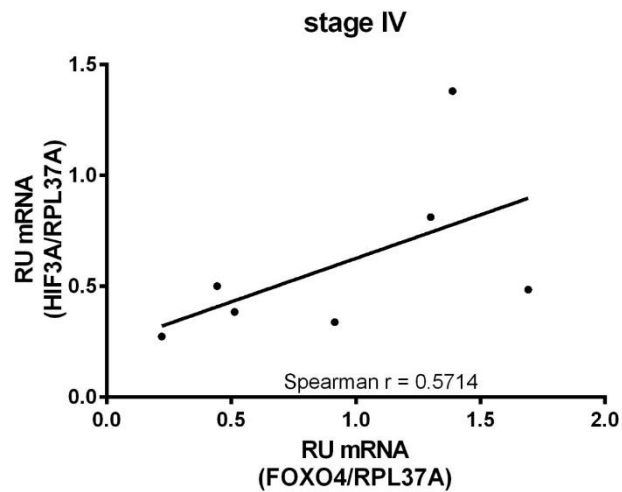
Фигура 34. Корелация на SIRT6 с FOXO4 при стадий IV пациенти. Spearman $r=0.6429$ ($p=0.1389$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на SIRT6 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий IV пациенти (фигура 35). Установи се наличието на силна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.8214$ със статистическа значимост $p=0.0341$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).



Фигура 35. Корелация на SIRT6 с HIF3A при стадий IV пациенти. Spearman $r=0.8214$ ($*p=0.0341$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Нивата на експресия на FOXO4 бяха корелирани с тези на HIF3A за стадий IV пациенти (фигура 36). Установи се наличието на средна корелация при изчислен корелационен коефициент $r=0.5714$ без статистическа значимост $p=0.200$. Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A).

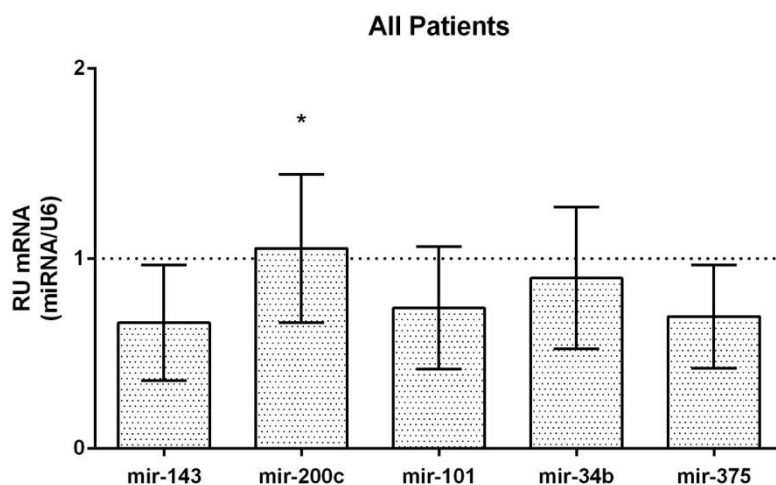


Фигура 36. Корелация на FOXO4 с HIF3A при стадий IV пациенти. Spearman $r=0.5714$ ($p=0.200$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A.

Expression levels of miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b and miR-375

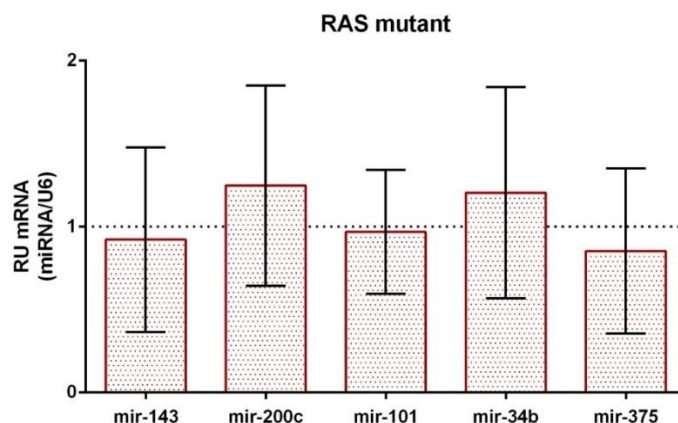
Определени бяха експресионните нива на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b and miR-375 миРНК в туморите на колоректален карцином в сравнение с експресионните им нива в здрава съседна тъкан, получена от резекционните линии. Резултатите са отчетени за всички пациенти, съгласно RAS мутационния статус и според стадирането. Експресията се измерва чрез qPCR и се нормализира спрямо U6 гена.

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при всички пациенти с КРК са представени на фигура 37 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. Наблюдава се намалена експресия на miR-143, miR-101, miR-34b и miR-375 и липса на промяна в експресията на miR-200c.



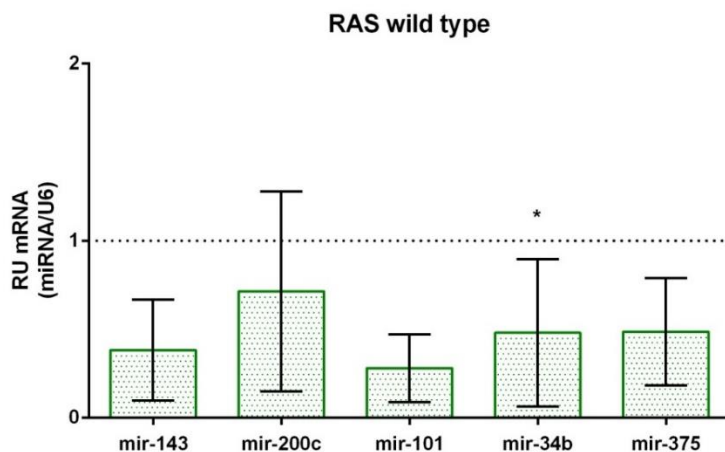
Фигура 37. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при всички пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.* $p < 0.05$

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при RAS мутантни пациенти с КРК са представени на фигура 38 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. Установени са повишени нива на miR-200c и miR-34b, понижени нива на miR-375 и липса на промяна в нивата на експресия на miR-143 и miR-101.



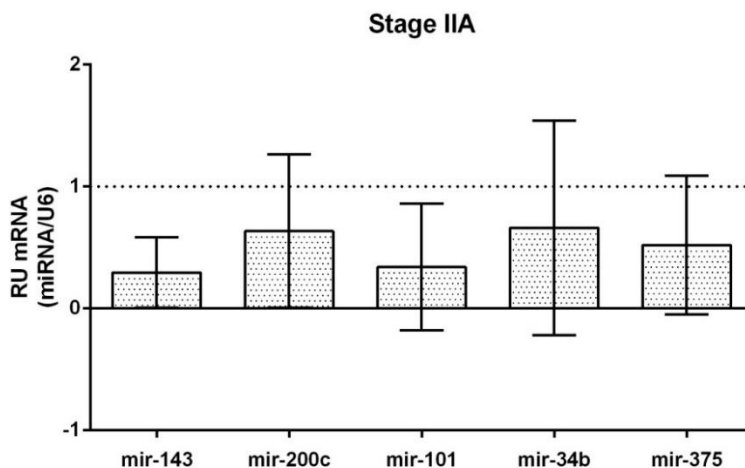
Фигура 38. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при RAS мутантни тумори. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при RAS див тип пациенти с КРК са представени на фигура 39 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. Установени са понижени нива за всички miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375.



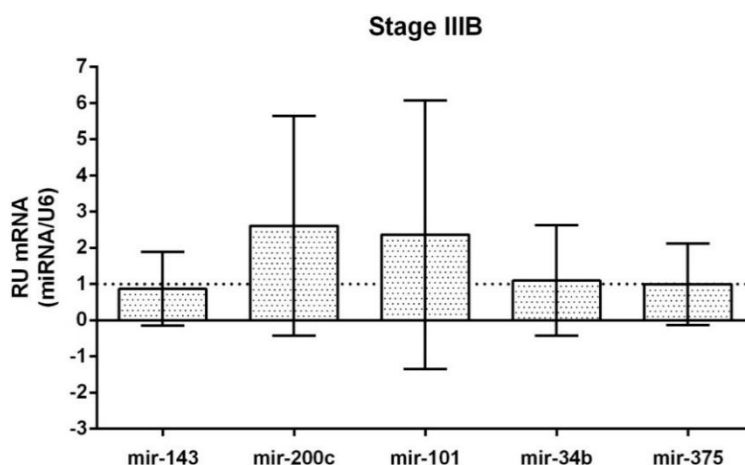
Фигура 39. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при RAS див тип тумори. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.*p<0.05

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при стадий IIa пациенти с КРК са представени на фигура 40 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. При стадий IIa, е установено намаляване на нивата на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375.



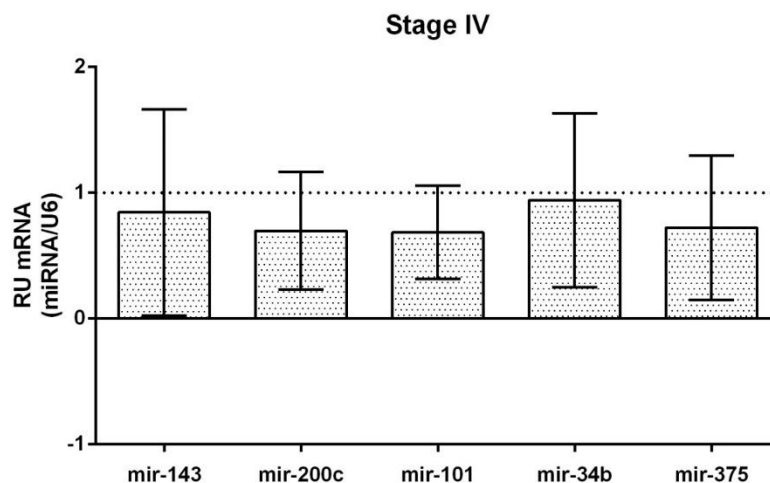
Фигура 40. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при стадий IIa пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при стадий IIIb пациенти с КРК са представени на фигура 41 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. При IIIb стадий, се откриват повишени нива miR-200c и miR-101 и липса на промяна за miR-143, miR-34b и miR-375.



Фигура 41. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при стадий IIIb пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендегенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Резултатите за отделните миРНК свързани с пролиферацията на раковите клетки при стадий IV пациенти с КРК са представени на фигура 42 и отразяват относителната генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. При IV-стадий, са установени намалени нива на miR-200c, miR-101 и miR-375 и липса на промяна за miR-143 и miR-34b.

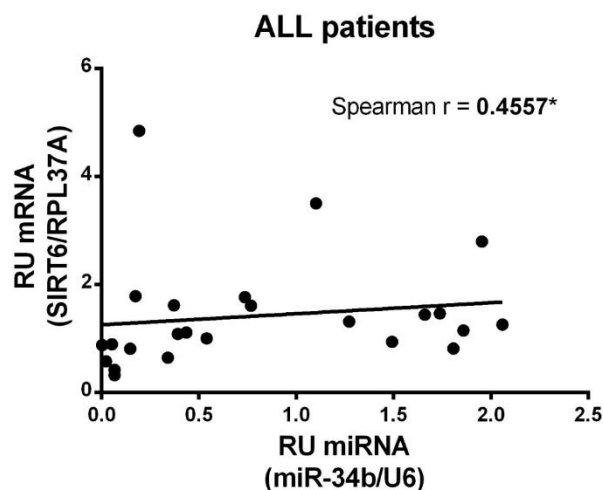


Фигура 42. Относителна генна експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от колоректален карцином при стадий IV пациенти. Нивата на експресия са измерени чрез qPCR, нормализирани срещу U6 гена, който е използван като ендогенна референтна контрола. Генната експресия е изразена в относителни единици (RU), като стойността 1 по оста Y показва единиците експресия в здравата тъкан на калибратора.

Корелационен анализ между миРНК и SIRT6, FOXO4 и HIF3A

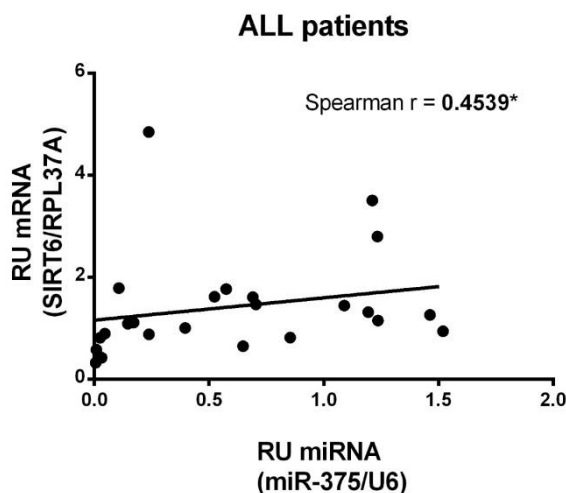
Нивата на експресия на miR-143, miR-101, miR-200c, miR-34b and miR-375 са корелирани с тези на SIRT6, FOXO4 and HIF3A за всички пациенти и спрямо мутационния RAS статус. Представени са само резултатите от корелационния анализ, които имаха статистическа значимост ($p > 0.05$).

На фигура 43 са представени нивата на експресия на SIRT6, корелирани с тези на miR-34b за всички пациенти. Установеня бе средна корелация ($r = 0.6649$), със статистическа значимост ($p = 0.0252$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за SIRT6 и U6 за miR-34b.



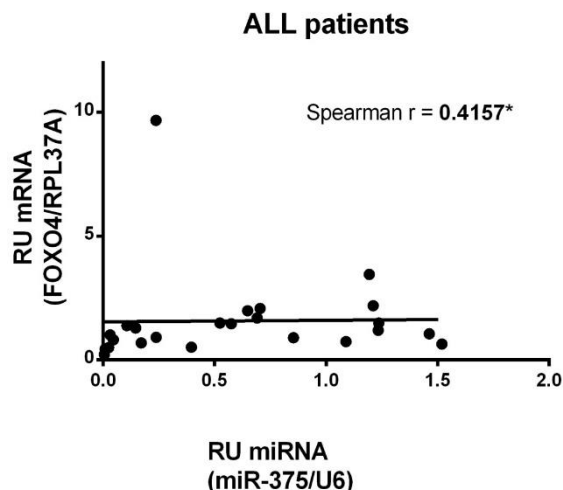
Фигура 43. Корелация на SIRT6 с miR-34b при всички пациенти. Spearman $r=0.4557$ ($*p=0.0252$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 44 са представени нивата на експресия на SIRT6, корелирани с тези на miR-375 за всички пациенти. Установена бе средна корелация ($r=0.4539$), със статистическа значимост ($p=0.0259$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за SIRT6 и U6 за miR-375.



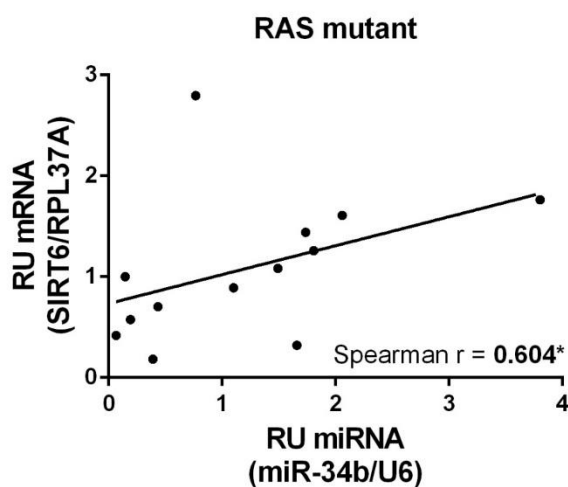
Фигура 44. Корелация на SIRT6 с miR-375 при всички пациенти. Spearman $r=0.4539$ ($*p=0.0259$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 45 са представени нивата на експресия на FOXO4, корелирани с тези на miR-375 за всички пациенти. Установена бе средна корелация ($r=0.4157$), със статистическа значимост ($p=0.0434$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за FOXO4 и U6 за miR-375.



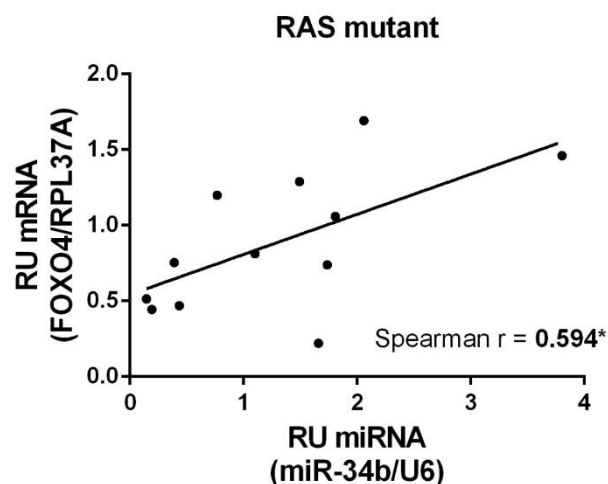
Фигура 45. Корелация на FOXO4 с miR-375 при всички пациенти. Spearman $r=0.4157$ ($*p=0.0434$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 46 са представени нивата на експресия на SIRT6, корелирани с тези на miR-34b за RAS мутантни пациенти. Установена бе средна корелация ($r=0.604$), със статистическа значимост ($p=0.032$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за SIRT6 и U6 за miR-34b.



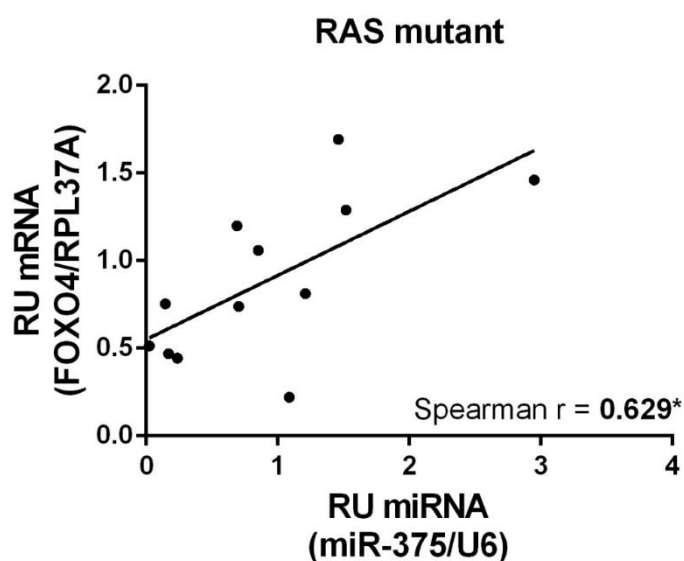
Фигура 46. Корелация на SIRT6 с miR-34b при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.604$ ($*p=0.032$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 47 са представени нивата на експресия на SIRT6, корелирани с тези на miR-34b за RAS мутантни пациенти. Установена бе средна корелация ($r=0.594$), със статистическа значимост ($p=0.046$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за SIRT6 и U6 за miR-34b.



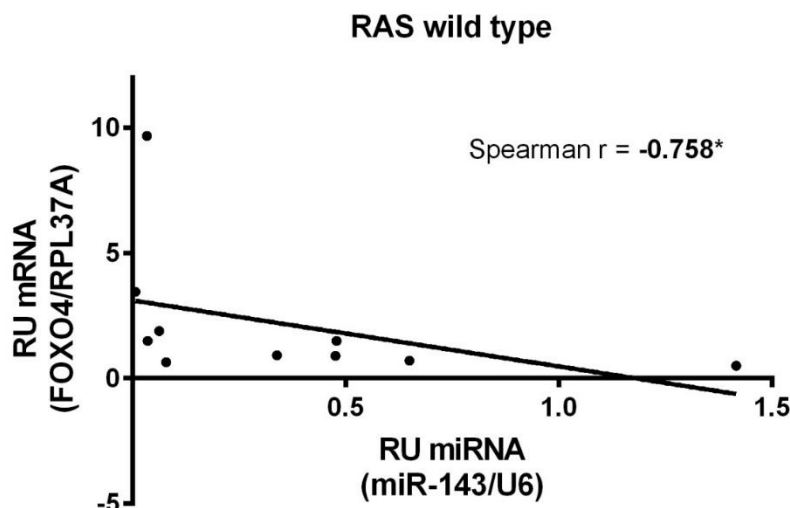
Фигура 47. Корелация на FOXO4 с miR-34b при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.594$ (* $p=0.046$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 48 са представени нивата на експресия на FOXO4, корелирани с тези на miR-375 за RAS мутантни пациенти. Установена бе средна корелация ($r=0.629$), със статистическа значимост ($p=0.032$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за FOXO4 и U6 за miR-375.



Фигура 48. Корелация на FOXO4 с miR-375 при RAS мутантни пациенти. Spearman $r=0.629$ (* $p=0.032$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

На фигура 49 са представени нивата на експресия на FOXO4, корелирани с тези на miR-143 за RAS див тип пациенти. Установена бе средна отрицателна корелация ($r=-0.758$), със статистическа значимост ($p=0.015$). Нивата на експресия са нормализирани спрямо ендогенен Ribosomal Protein L37A (RPL37A) за FOXO4 и U6 за miR-143.



Фигура 49. Корелация на FOXO4 с miR-143 при RAS мутантни пациенти. Spearman $r = -0.758$ ($*p = 0.015$). Относителните единици на генна експресия са нормализирани спрямо RPL37A и U6.

Дискусия

Оптимизиран протокол за молекулен анализ

В продължение на много години формалиновото фиксиране се използва като метод за запазване на морфологичните характеристики на тъканите и за подпомагане на диагностичния процес (145). При разработването на аналитични методи за количествен анализ на нуклеинови киселини се наложи и необходимостта от подобряване на методологията за изолиране на нуклеинови киселини от тъканни проби на FFPE, за да се сравнят нивата на генната експресия при различните използвани протоколи (146). Смята се, обаче, и дори е доказано, че нуклеиновите киселини изолирани от FFPE тъкани, деградират и се фрагментират в много голяма степен поради фиксирането с формалин (147). Изследвания върху иРНК изолирана от FFPE, доказват получаване на кръстосани връзки между протеин-РНК (cross-linking) (148). Поради това се изискват много модификации на стандартните протоколи, когато се използва такъв материал за аналитични изследвания, за да се постигне максимално качество и количество на извлечената РНК.

Изолирането на РНК се извършва най-вече чрез лизиране с протеиназа К и е една от най-широко използваните стратегии от много търговски компании, които предлагат готови китове за изолиране на РНК (149). Допълнителна стъпка на загряване е включена за подобряване на синтеза на кДНК, тъй като премахва кръстосаните връзки между РНК и протеините (150). Допълнителен етап на пречистване с фенол улеснява екстракцията и подобрява добива на изолационната РНК (151).

В това изследване ние оценихме три различни метода за екстракция на РНК, за да определим тяхната ефективност при екстракцията на тотална РНК от FFPE тъкан. Тези методи включват основните техники, като използване на тъканен лизис буфер и екстракция с фенол – базиран реагент, както и комбинацията от тези два метода. Комбинацията от двата метода даде най-високия добив, както се и очакваше, докато екстракцията на основата на фенол не успя да постигне

висок добив до приемливо ниво за анализи и в резултат на това беше изключена от последващите експерименти. Чрез замяната на традиционното утаяване на РНК с етанол с колони със силикагел, ние успяхме да осигурим максимална ефективност и чистота на извлечените РНК матрици.

Както беше споменато по-горе, деградирането и модификациите на РНК компрометират реакцията на обратна транскрипция и директно повлияват синтезата на кДНК. Няколко метода бяха тествани за такива РНК. Бяха използвани модифицирани протоколи, използващи oligodT и комбинация от oligodT и произволни хексамерни праймери, за сравнение на тяхната ефективност (152). Ефективността на синтезата на кДНК от предходните протоколи беше сравнена с протокол, използващ ген специфични праймери за синтез на първична кДНК на набор от гени. Използването на qPCR анализи показва много висока чувствителност на последния метод при сравнението му с другите два (153).

Във връзка с необходимостта от получаването на по-висок добив от кДНК бяха сравнени три стратегии за синтез за кДНК. Анализът на резултатите чрез използване на C_t стойностите, получени при qPCR амплификация, показва, че използването на oligodT при обратна транскрипция води до най-малко ефективния синтез на кДНК. Това най-вероятно се дължи на голямата степен на разграждане на РНК матрици при приготвянето на FFPE тъканите. Комбинацията от oligodT и случаен хексамерен праймер, както и използването на ген специфичен праймер, преодолява този проблем, като стратегията с ген специфичен праймер превъзхожда останалите две (използващи oligodT и комбинация от oligodT и случаен хексамерен праймер). Това се отнася както за екстракцията на РНК с използването на лизиращ буфер, така и за екстракциите с използване на лизиращ буфер и фенол едновременно (Таблица 3).

За да се увеличи чувствителността на анализа, ние изследвахме и ефекта от таргетна преамплификация на кДНК матриците. При сравняване на C_t стойностите, получени чрез qPCR с използването на преамплифицирана и не преамплифицирана матрица, на всички стратегии за синтез на кДНК за двата метода на екстракция на РНК, заключаваме, че преамплификацията може да се използва за кДНК, синтезирани с ген специфичен праймер (Таблица 4), като се вземат под внимание стриктните условия, при които реакцията на преамплификация се извършва. Използваните 5 μ L кДНК матрица съответстващи на 125 ng от транскрибираната тотална РНК, се прилагат за преамплификация при малък брой цикли ($p = 5$) за избягване на колебания, дължащи се на шумовия фон. Предполага се, че ниската крайна концентрация на праймерите, например 50 μ M, и температура на аналитич-елонгация от 60° C намаляват неспецифичната амплификация. За да се компенсира ниската концентрация на праймера, времето на термообработка беше увеличено на ≥ 3 минути (154).

За да се провери ефективността на преамплификацията, преамплифицираните продукти бяха количествено определени чрез стандартна крива. По този начин всяко от несъответствията и вариациите бе оценено и коригирано. Наблюдавана бе по-висока стойност на C_t от 5.5, в сравнение с 5 цикъла на амплификация. Това може да се дължи на грешки при пипетирането или на остатъчна ниска активност на ДНК полимеразата по време на размразяването на пробата преди амплифицирането на прицелните гени. Освен това, високите фактори на разреждане могат да доведат до грешки, а те от своя страна могат да доведат до

отклонения в стандартната крива (146). Затова при извършване на анализ на генната експресия, за да се потвърди валидността на ΔC_t стойностите, в случай, че се използва предварителна амплификация, препоръчваме да се създава крива от серийни разреждания за селективна ендогенна контрола на специфичните гени, които ще бъдат изследвани.

Стадиране на пациентите и RAS мутационен статус и профил

Пациентите с колоректален карцином, подбрани за текущите анализи, се класифицират според размера на тумора, инвазията му в лимфните възли и метастазите според патологичните промени. От общо 42 пациенти: 5% бяха в стадий I с локален малък размер на *in situ* тумор, 19% - в стадий IIa с локално напреднал по-голям размер на тумора, 24% в IIb стадий с напреднал тумор и инвазия в няколко (<3) регионални лимфни възли, 5% - в стадий IIc с напреднал тумор и инвазията в повече (>3) регионални лимфни възли, а 26% - с напреднала туморна инвазия на лимфни възли и отдалечени метастази (Фигура 8).

Бе извършена молекулярна диагностика за статус и профил на мутации в RAS гени в туморите на включените в проучването пациенти. Според RAS мутационния статус, 48% от туморите бяха от див тип RAS, 36% - KRAS мутантни, 7% - NRAS мутантни, а за 9% от туморите резултатите бяха не достатъчно достоверни (Фигура 9). Според мутационния профил на RAS мутантни тумори, 72% от туморите имаха мутация в екзон 2 на KRAS, 11% - мутация в екзон 4 на KRAS, 11% - в екзон 2 на NRAS и 6% - в екзон 3 на NRAS (Фигура 10). Тези резултати са в съответствие с вече наблюдаваното и изследвано разпространение на RAS мутационния статус и профила при други групи пациенти с КРК в подобни проучвания в други популации (78,79,89,155).

Експресионен анализ на SIRT6

Според съвременните данни SIRT6 функционира като ген за осигуряване на дълголетие чрез поддържане на геномната стабилност, регулиране на метаболитните процеси и намаляване на възпалението (156). SIRT6 функционира като ADP-рибозилаза и NAD^+ зависима деацетилаза както на ацетилни групи, така и на мастни ацилни групи с дълги вериги и регулира поправянето на ДНК, поддържането на теломерите и метаболизма на глюкозата и липидите, като по този начин повлиява метаболитните и свързаните с възрастта заболявания като рак (42). Усилената гликолиза при аеробни условия е характерен процес на метаболитно препрограмиране в раковите клетки (43). При сравнение на нормални, не-трансформирани клетки с ракови е показано, че увеличената експресия на SIRT6 индуцира масивна апоптоза в различни ракови клетъчни линии. Тази клетъчна смърт изисква моно-ADP-рибозилтрансферазна активност на SIRT6 и се подпомага от активирането както на p53-, така и на p73-зависими апоптотични сигнални каскади в раковите клетки чрез SIRT6 (156).

Ред проучвания върху различни видове рак на човека показват намаляване или увеличаване на експресията на SIRT6, като такива промени се появяват дори на различни етапи от развитието на същия тип рак (42). Това определя SIRT6 едновременно като онкоген и като тумор супресорен ген. Тази функция на SIRT6 и ефектът му върху метаболизма могат да бъдат вторични заради

увеличената експресия на SIRT6, целящи да се осигури геномна стабилност. Вероятно в ранните стадии на развитието на рака, ниската експресия на SIRT6 има за резултат геномна нестабилност и метаболитно репрограмизиране, което води до натрупване на мутации и ускоряване на метаболизма и производство на метаболити, необходими за пролиферацията на раковите клетки (42). В допълнение, ускорената пролиферация заедно с геномна нестабилност може да допусне възникването на последващи мутации в онкогени, като KRAS. В напредналите етапи високата активност на SIRT6 може да има защитна функция срещу натрупване на допълнителни мутации в туморните клетки, които могат да повлияят отрицателно туморния растеж (42).

В настоящото проучване, чрез сравняване на нивата на експресия на SIRT6 между тумори и съседни здрави чревни тъкани от пациенти с КРК, установихме значително увеличена експресия на SIRT6 при всички пациенти ($p < 0.05$) (Фигура 11). При разделянето на пациентите по RAS мутационния им статус, ние открихме по-висока експресия в RAS див тип пациентите (Фигура 13), приблизително два пъти по-висока, отколкото при RAS мутантните пациенти (Фигура 12, Фигура 14). Този резултат е в съгласие с гореспоменатото предположение, че туморите могат да потискат функцията на SIRT6, отговорен за повишаване на геномната стабилност, за да допуснат раковите клетки да придобият нови мутации. Тези мутации ще продължат да подпомагат разпространението и инвазивността на тумора. Според стадирането на рака, при локално напреднали тумори на пациенти в стадий IIa експресията на SIRT6 изглежда намалена (Фигура 15). От друга страна, при пациенти в IIIb стадий с напреднали инвазивни тумори, SIRT6 показва значително повишена експресия (Фигура 16). Освен това, при пациенти в стадий IV с метастатични тумори, SIRT6 показва ограничена, но увеличена експресия (Фигура 17, Фигура 18). Тези резултати съответстват на предполагаемия модел на експресията на SIRT6 при прогресията на рака, предложен от Kugel и Mostoslavsky (2014). В ранните стадии намаляването на SIRT6 води до натрупване на мутации чрез геномна нестабилност и предизвиква метаболитно репрограмизиране. В по-късните стадии SIRT6 показва увеличена експресия, избор, който осигурява защита от допълнителни мутации, които могат да бъдат натрупани в раковите клетки и потенциално смъртоносни за тях.

Експресионен анализ на FOXO4

Под действиена епидермалния растежен фактор, FOXO4 се фосфорилира, което има за резултат намаляване на експресията на ANXA8, процес, отговорен за трансформацията от епител в мезенхим (59). EGFR активира PI3K и АКТ, което води до фосфорилиране на FOXO4, което от своя страна инхибира транскрипцията на ANXA8. В резултат фосфорилираният FOXO4 премахва способността на ANXA8 да инхибира клетъчните миграционни и метастатични характеристики на колоректалните ракови клетки. По този начин FOXO4 играе ключова роля в иницирането на туморни метастази, медирано от растежния фактор, по време на преходната промяна от епидермис към мезенхим при колоректалния рак (59).

Според това изследване, чрез сравняване на нивата на експресия на FOXO4 между тумори и съседна здрава тъкан от дебело черво на пациенти с CRC, установихме, че при всички пациенти се наблюдава значително увеличена експресия на FOXO4 ($p < 0.05$) (Фигура 11). При разделянето на пациентите в

съответствие с RAS мутационния статус открихме по-висока експресия при RAS див тип пациенти (Фигура 13), приблизително два пъти по-висока от тази в здравата тъкан на дебелото черво. При RAS мутантен статус има ограничено увеличение на експресията в сравнение със здравата тъкан на дебелото черво (Фигура 12). Очевидно постоянно активираният RAS онкоген, въпреки че активира следващия в каскадата ген - PI3K, водещ до инактивиране на FOXO4 транскрипционен фактор, не променя значително експресията на последния (Фигура 2). От друга страна, нивата на експресия на FOXO4 са повишени при див тип RAS пациенти. Това навежда на предположението, че при активиране на EGFR, активирането на PI3K води до деактивиране на FOXO4 транскрипционен фактор, който на свой ред стимулира експресията на FOXO4 гена. Според представата за развитието на рака при локално напреднали тумори в стадий IIa, експресията на FOXO4 изглежда значително намалена ($p < 0.05$) (Фигура 15). От друга страна, при пациенти с напреднали инвазивни тумори в стадий IIb, FOXO4 има значително повишена експресия ($p < 0.01$) (Фигура 16). При пациенти в стадий IV с метастатични тумори, FOXO4 е с намалена експресия (Фигура 17, Фигура 18). Това, най-вероятно, би могло да се дължи на факта, че при локално напреднали тумори, транскрипционният фактор FOXO4 може да бъде силно активен и да предотвратява бързото нахлуване на раковите клетки в екстраморалните тъкани, като например лимфните възли. Това може да е свързано с отрицателно обратно регулиране на транскрипцията на FOXO4 гена. В по-напредналите IIb стадии, раковите клетки могат да дезактивират екстензивното фосфорилиране на FOXO4 транскрипционния фактор и в опит да компенсират инактивирането, експресията на FOXO4 гена да се увеличава. При стадий IV незначителните промени в нивата на експресия на FOXO4 могат да бъдат приписани на факта, че раковите клетки са развили механизъм за заобикаляне на FOXO4 инхибиторните ефекти по отношение на инвазивността и метастазирането.

Експресионен анализ на HIF3A

HIF3A се индуцира от хипоксия, но ефектът върху клетъчния отговор е индиректен, тъй като увеличената експресия на HIF3A инхибира транскрипционното активиране на репортер, който показва присъствие на хипоксия в анализиранияте проби, чрез HIF-1 и HIF-2 (70). Едно проучване показва, че свръхекспресията на HIF-3a1 значително увеличава растежа на колоректалните туморни клетки чрез активиране на STAT3 сигналния път чрез свързване с JAK (62).

Според настоящото изследване, при сравняване на нивата на експресия на HIF3A в тумори и в съседни здрави тъкани от дебело черво на пациенти с КРК, бе установена повишена експресия на HIF3A при всички пациенти (Фигура 11). При разделянето на пациентите в съответствие с RAS мутационния статус, ние открихме сходна по-висока експресия при RAS див тип пациенти и RAS мутанти (Фигура 12, Фигура 13, Фигура 14). Това показва, че вероятно експресията на HIF3A не е повлияна от RAS сигналната каскада. Според стадирането на рака, при локално напреднали тумори на пациенти в стадий IIa, експресията на HIF3A бе увеличена (Фигура 15). В същото време, при пациенти в стадий IIb с напреднали инвазивни тумори, се наблюдава увеличена експресия на HIF3A (Фигура 16). Обратно, при пациенти в стадий IV с метастатични тумори, HIF3A показва значително намалена експресия ($p < 0.05$) (Фигура 17,

Фигура 18). Това може да се обясни със способността на HIF3A да инхибира HIF1A, отговорна за клетъчната пролиферация при хипоксични условия. В стадии IIa и IIb увеличената експресия на HIF3A инхибира препролиферативните свойства на раковите клетки като защитен механизъм. От друга страна, при метастатичен рак в стадий IV инхибиторният ефект на HIF3A се отменя, вероятно поради по-нататъшната еволюция на раковите клетки, която ги прави нечувствителни към хипоксия и свързаните с нея разпространение, инвазия и пролиферация. Въпреки това, ефектите на HIF3A изискват допълнително проучване, тъй като има изследвания, които показват, че експресията на различни HIF3 варианти предизвиква противоположни ефекти и засяга различно прогнозата за пациентите (70).

Корелационен анализ на експресията между SIRT6, FOXO4, HIF3A

При извършването на корелационен анализ между нивата на експресия на SIRT6, FOXO4 и HIF3A, бе установено наличието на значителна силна корелация между SIRT6 и FOXO4 ($p < 0.001$) както и между SIRT6 и HIF3A при всички пациенти ($p < 0.001$) (Фигура 19, Фигура 20). Освен това, бе открито наличието и на значителна средна корелация между FOXO4 и HIF3A при всички пациенти ($p < 0.05$) (Фигура 21). Това частично доказва хипотезата, че FOXO4 активира SIRT6, който в комбинация с HIF3A инхибира пролиферативния ефект на HIF1A в раковите клетки (Фигура 2).

Средна корелация между SIRT6 и FOXO4 ($p > 0.05$) и средната корелация между SIRT6 и HIF3A ($p < 0.05$) бяха наблюдавани и за дивия тип RAS пациенти (Фигура 25, Фигура 26), а за RAS мутантните - значителна средна корелация между SIRT6 и FOXO4 ($p < 0.01$) и средна корелация между SIRT6 и HIF3A ($p > 0.05$) (Фигура 22, Фигура 23). Това може да бъде обяснено с факта, че и двата гена - и SIRT6, и FOXO4 участват в сигналната каскада на RAS, като тяхната експресия се повлиява на много от по-ранните стъпки от сигналната каскада, в която участват и то от различни фактори (Фигура 2).

Съгласно стадирането, при пациенти в стадий IIa е установено средно отрицателна корелация между нивата на експресия на SIRT6 и FOXO4, както и средно отрицателна корелация между FOXO4 и HIF3A (Фигура 28, Фигура 30). Това би могло да се обясни с факта, че в ранните стадии намалената експресия на FOXO4 е съпроводена с понижено фосфорилиране на FOXO4, което води до активиране на транскрипционния фактор, способен да достигне клетъчното ядро и да предизвика увеличение в експресия на прицелни гени, какъвто е именно SIRT6. За пациенти в стадий IIb се установи средна корелация между SIRT6 и HIF3A (Фигура 32). Това показва възможното синергично действие на SIRT6 и HIF3A за потискане на HIF1A (Фигура 2) в опит да се ограничи пролиферацията на тумора и / или да се осигури геномна стабилност на вече агресивните ракови клетки. Съответно, за пациентите в стадий IV се установи значимо средна към висока корелация между SIRT6 и HIF3A ($p < 0.05$) (Фигура 35), както и средна корелация между SIRT6 и FOXO4 и между FOXO4 и HIF3A (Фигура 34, Фигура 36). При най-напреднал метастазен рак повишената експресия на SIRT6 осигурява геномна стабилност и предотвратява натрупването на повече мутации и експресията на FOXO4 се увеличава, за да компенсира повишената скорост на фосфорилиране и по този начин деактивиране.

Експресионен анализ на подобрани зрели miRNA

miRNA-143

Според проучванията от литературата експресията на miR-143 е намалена при КРК и това забавя метаболизма на глюкозата и инхибира пролиферацията на раковите клетки и образуването на тумори чрез инхибиране на хексокиназа 2 (103). Освен това, miRNA-143 участва в KRAS сигнализиращата каскада чрез инхибиране на KRAS иРНК, за да повлияе пролиферацията и преживяемостта на КРК клетки (105). Проведени са изследвания, които описват ниски нива на експресия на miRNA-143 при КРК (104).

В нашето изследване miR-143 показва намалена експресия в туморната тъкан при всички пациенти в сравнение със здравата тъкан на дебелото черво (Фигура 37). Въпреки това, при RAS мутантните пациенти експресията на miR-143 изглеждаше непроменена (Фигура 38), докато при RAS пациентите с див тип бе понижена (Фигура 39). Това би могло да означава, че мутациите в RAS гените, с изключение на това, че водят до постоянно активиране, също активират и неясен защитен механизъм по отношение на miR-143, потискащ експресията ѝ. Според стадирането, при пациенти в стадий IIa експресията на miR-143 е понижена (Фигура 40), а при пациенти във фаза IIIb и IV експресията на miR-143 остава непроменена (Фигура 41, Фигура 42). Обяснението на това наблюдение може да е свързано с това, че пациентите от най-напредналите стадии са с множество мутации в RAS гените.

miRNA-200c

Има данни, че увеличената експресия на miR-200c в клетъчните линии на CRC причинява намалена експресия на предполагаеми прицелни гени и води до повишаване на Е-кадхерина и намалена експресия на виментин (111). MiR-200c играе важна роля в медиацията на EMT и метастатичното поведение в дебелото черво. Тъканта на чернодробните метастази показва по-висока експресия на miR-200c, отколкото първичните CRCs, което е свързано с хипометилиране на генния промоторен регион (111).

Нашите изследвания не установяват промяна в нивата на експресия на miR-200c в туморната тъкан в сравнение със съседната здрава тъкан на дебелото черво при всички пациенти (Фигура 37). При пациенти с мутанти RAS профил обаче, се наблюдава леко увеличение на експресията (Фигура 38) и противоположно понижена експресия при пациенти с див тип RAS профил (Фигура 39). Това може да означава, че при тумори от див тип RAS, miR-200c е фактор, който способства за образуването на метастази. За тумори от пациенти в стадии IIa и IV, забелязахме понижена експресия на miR-200c (Фигура 40, Фигура 42). Противоположно, за тумори от стадий IIIb, има повишена mi-200c експресия (Фигура 41). Това би могло да се разглежда като един вид контролно-пропускателен пункт за получаване на метастатичен потенциал от раковите клетки.

miRNA-101

Според наличните в литературата проучвания, miR-101 инхибира транслацията на COX-2 иРНК в клетъчни линии и при пациенти с колоректален карцином

(116). Освен това, miR-101 понижава SphK1 и PDK и протеиновата експресия, стимулираща про-апоптотично производство на церамид в клетъчните линии на CRC, както и експресията на miR-101 повишава *in vitro* анти-CRC активността на конвенционалните химиотерапевтични агенти като паслитаксел и доксорубин (117). В допълнение, про-туморогенната активност на простаноидния EP4 рецептор е отрицателно регулирана от miR-101 на пост-транскрипционно ниво. Също така, miR-101 инхибира клетъчната пролиферация и миграция на клетки от рак на дебелото черво *in vitro* и има обратна корелация между нивата на miR-101 и експресията на EP4 рецепторния протеин при колоректален карцином (157).

Според нашето изследване нивата на експресия на miR-101 бяха с понижена експресия във всички CRC тумори в сравнение със здравата съседна тъкан (Фигура 37). При анализа на експресията на miR-101 в туморите, разделени според RAS мутационния статус, при пациентите с RAS мутации не се наблюдаваха промена в експресията на miR-101 (Фигура 38). Обратно, експресията на miR-101 изглежда намалена при пациенти с див тип RAS гени (Фигура 39). Това може да означава, че каскадата за сигнализиране на RAS може да повлияе пролиферацията на тумора чрез включването на miR-101. При пациенти от стадии IIa и IV, наблюдавахме намалена експресия на изследваната miPDK (Фигура 40, Фигура 42). Обратно, при пациенти в стадий IIIb имаше увеличение в нивата на miR-101 (Фигура 41). На този стадий miR-101 може да проявява увеличена експресия в опит да се потисне ускорената пролиферация на туморните клетки.

miRNA-34b

MiR-34b инхибира клетъчната пролиферация, образуването на колонии, миграцията/инвазията и предизвиква спиране на клетъчния цикъл на етап G/G1 и апоптоза чрез директно регулиране на AKT и неговите пролиферативни гени. Експресията на miR-34b намалява Vimentin, ZO1, N-cadherin и Snail и увеличава експресията на E-cadherin. По този начин miR-34b инхибира прехода от епителни към мезенхимни клетки, както и проявява антитуморен ефект *in vivo*. Съответно, пациентите с високи нива на miR-34b са с по-дълга преживяемост (120).

Според нашето изследване, нивата на експресия на miR-34b са намалени незначително във всички CRC тумори в сравнение със здравата съседна тъкан на дебелото черво (Фигура 37). При разделянето на туморите в съответствие с RAS мутационния статус се установи, че в мутантните RAS тумори miR-34b проявява средно увеличена експресия (Фигура 38). Напротив, експресията на miR-34b бе значително намалена при пациенти с див тип RAS статус (Фигура 39). Това е в съответствие с намалената експресия на SIRT6 при пациенти с див тип RAS профил и свързаното отсъствие на инхибиращ ефект на SIRT6 върху експресията на miR-34b (Lai et al., 2013). При тумори на пациенти в стадий IIa, ние забелязахме слабо увеличена експресия на изследваната miPDK (Фигура 40). За пациентите в стадий IIIb и IV почти не се установиха промени в експресионните нива на miR-34b в туморите в сравнение със здравата съседна тъкан (Фигура 41, Фигура 42).

miRNA-375

Литературните данни показват, че miR-375 проявява понижена експресия в клетъчни линии и в тъкани на човешки колоректален рак в сравнение с нормалните човешки тъкани на дебелото черво (125). Увеличената експресия на miR-375 в SW480 и HCT15 клетки се свързва с намаляване на експресията на протеина PIK3CA. Освен това, miR-375 потиска пролиферацията на CRC клетки и образуването на колонии и води до спиране на клетъчния цикъл. Увеличената експресия на miR-375 инхибира сигналния път на фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K) / Akt и може да осигури селективно инхибиране на растежа на CRC клетки (125).

Нашите резултати показват, че при CRC тумори от всички пациенти miR-375 е с намалена експресия в сравнение със здравата съседна тъкан на дебелото черво (Фигура 37). Чрез сравняване на нивата на експресия между тумори с RAS мутации и от див тип открихме незначително понижени нива на експресия за RAS мутантните пациенти (Фигура 38) и понижени нива за пациенти с див тип RAS профил. При туморите от пациентите в стадий IIa забелязахме намалена експресия (Фигура 40). Значението на намаляването на нивата на експресия на miR375 може да се обясни с повишена активност на PI3K / Akt сигнализиращия път. Този сигнален път води до деактивиране чрез фосфорилиране на потенциалния туморен супресор FOXO4 (Фигура 2). При стадий IIb няма промяна в нивата на експресия на изследваната miRNA (Фигура 41). При туморите в стадий IV са наблюдавани слабо намалени нива на експресия на miR-34b в сравнение със здравата съседна тъкан (Фигура 42).

Корелационен анализ на miRNAs и SIRT6, FOXO4, HIF3A

За да се идентифицира възможно функционално взаимодействие между изследваните miRNAs и гените за SIRT6, FOXO4 и HIF3A, ние извършихме корелационен анализ и чрез използването на корелационна матрица идентифицирахме значителните корелации.

Резултатите показват наличието на значителна средна положителна корелация между SIRT6 и miR-375 по отношение на всички пациенти (Фигура 44), свързано най-вероятно със способността на miR-375 да инхибира PI3K / AKT пътя, който от своя страна не успява да деактивира FOXO4 чрез фосфорилиране. В този смисъл хипотетично е възможно наистина FOXO4 да използва SIRT6, за да осигури геномна стабилност. Допълнително, ние идентифицирахме значителна средна положителна корелация между FOXO4 и miR-375 за всички пациенти (Фигура 45) и дори по-висока корелация за тумори на RAS мутантни пациенти (Фигура 48), наблюдение, индикативно за положителния ефект на високите miR-375 нива върху експресията на FOXO4.

Чрез корелиране на нивата на експресия на SIRT6 и miR-34b ние идентифицирахме значима корелационна зависимост за всички пациенти (Фигура 43) и RAS мутантните (Фигура 46), като тази за мутантните случаи бе по-висока. Освен това, ние идентифицирахме значителна корелация между FOXO4 и miR-34b за RAS мутантни тумори (Фигура 47), както се очакваше. Това потвърждава вероятността miR-34b и SIRT6-FOXO4 взаимодействието да бъдат функционално синергично свързани, което се установява за случаите с мутации в RAS.

Освен това, ние идентифицирахме значима средно негативна корелация между FOXO4 и miR-143 за тумори от див тип RAS (Фигура 49). Ниските нива на miRNA-143 експресията са независим отрицателен прогностичен фактор за

причинно-специфичната преживяемост (CSS). Освен това, ниските нива на експресия на miRNA-143 са свързани с по-кратка ПФС при пациенти с CRC от див тип KRAS, които се лекуват с агенти, насочени към EGFR. Въпреки това miRNA-143 не би могла да се използва като добър предиктивен биомаркер при KRAS пациенти с див KRAS, лекувани с агенти, таргетиращи EGFR (106). Освен това, инхибирането на miRNA-143 стимулира клетъчната пролиферация, докато свръхекспресията на miRNA-143 има противоположен ефект и инхибирането на KRAS експресията от miRNA-143 инхибира конститутивното фосфорилиране на ERK1 / 2 (105). Вероятно повишените нива на miR-143 биха могли да повлияят на сигналната каскада, използваща PI3K / AKT и водеща до намаляване на експресията на FOXO4.

Заклучение

В настоящото изследване бяха анализирани относителните нива на експресия на SIRT6, FOXO4 и HIF3A, както и нивата на експресията на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 микроРНК при тумори на колоректален карцином в сравнение със здрава съседна тъкан на дебелото черво. Анализирахме статистически туморите на пациентите според RAS мутационния статус и профила във връзка с резултатите от молекулярната диагностика. Забелязахме, че резултатите, получени за нашите пациенти, съответстват на литературните данни за мутационния статус в световен мащаб.

Чрез анализиране на резултатите колективно за всички тумори на нашите пациенти с КРК, RAS див тип и мутанти пациенти и според стадий IIa, IIb и IV, ние забелязахме следните зависимости. Има повишена експресия на SIRT6 при всички пациенти и експресията при тумори от див тип RAS е приблизително два пъти по-висока, отколкото при мутирани RAS пациенти. Според стадирането, при ранен стадий на КРК експресията на SIRT6 е намалена в сравнение с тази при пациентите в напреднал стадий, при които SIRT6 бе със значително повишена експресия. Забелязахме също така повишени нива на експресия на FOXO4 за всички пациенти, най-вече поради по-висока експресия при див тип RAS индивиди на фона на почти пълна липса на промяна в RAS мутантните пациенти. Според стадирането на пациентите експресията на FOXO4 бе намалена при тези в стадии IIa и IV. От друга страна, при пациентите в стадий IIb FOXO4 бе със значително повишена експресия. Освен това, забелязахме повишена експресия на HIF3A за всички пациенти и сходно висока експресия при RAS див тип и RAS мутантни тумори. Туморите от пациенти в стадий IIa и IIb показват повишена експресия на HIF3A спрямо тези в стадий IV, при които HIF3A показва намалена експресия.

Чрез корелация на нивата на експресия на SIRT6, FOXO4 и HIF3A се установи средно до висока корелация между SIRT6 и FOXO4, SIRT6 и HIF3A, както и средна корелация между FOXO4 и HIF3A при всички пациенти и при двата вида RAS див тип и мутантен тип. За туморите при пациенти в стадий IIa установихме наличието на средна отрицателна корелация между SIRT6 и FOXO4 и FOXO4 и HIF3A. За пациентите от стадий IIb намерихме средна корелация между SIRT6 и HIF3A. Съответно, за пациентите в стадий IV бе установена значителна средно по-висока корелация между SIRT6 и HIF3A, както и средна корелация между SIRT6 и FOXO4 и между FOXO4 и HIF3A.

Чрез анализиране на нивата на експресия на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 от тумори от всички на пациенти, ние открихме намаляване на експресията на miR-143, miR-101, miR-34b и miR-375 и липса на промяна в нивата на miR-200c в сравнение със здравата съседна тъкан на дебелото черво. За RAS мутанти тумори открихме повишени нива на miR-200c и miR-34b, понижени нива на miR-375 и липса на промяна в нивата на експресия на miR-143 и miR-101. За RAS див тип туморите открихме понижени нива за всички miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. Анализ според стадирането установи за IIa пациенти намалени нива на всички miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. За пациенти в стадий IIb открихме повишени нива на miR-200c и miR-101 и липса на промяна за miR-143, miR-34b и miR-375. Съответно, при пациенти в IV-стадий, ние открихме ниски нива на miR-200c, miR-101 и miR-375 и без промяна за miR-143 и miR-34b.

Чрез корелиране на нивата на експресия на гените SIRT6, FOXO4 и HIF3A с нивата на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375, установихме значителна средна корелация между SIRT6 и miR-375 по отношение на всички пациенти. В допълнение, установихме значителна средна корелация между FOXO4 и miR-375 за всички пациенти и дори по-висока корелация за тумори на пациентите с мутация на RAS гените. Ние идентифицирахме значителна средна корелация между SIRT6 и miR-34b за всички пациенти и RAS мутантни тумори, като корелацията за мутантни тумори бе по-висока. Освен това, идентифицирахме значима средна корелация между FOXO4 и miR-34b за RAS мутанти и значима средна отрицателна корелация между FOXO4 и miR-143 за див тип RAS пациенти. И накрая, подобрехме протоколите на молекулярния анализ, като приложихме модификации по методиката на протоколите. Комбинацията от лизиращ буфер за екстракция на РНК, базирана на фенол, заедно с ген- специфичен кДНК синтез има значително превъзходство пред другите стратегии, както и увеличаването на таргетна генна матрица чрез преамплификация намалява стойността на Ct и по този начин увеличава чувствителност и точност на анализа.

Изводи и приноси

Изводи

Анализиране на експресионните нива на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гените при тумори на колоректален карцином в сравнение със здрави съседни тъкани на дебелото черво от пациенти с КРК, според RAS мутационния статус и стадирането:

1. Установена е повишена експресия на SIRT6 при всички пациенти. Експресията на SIRT6 в див тип RAS пациенти е приблизително два пъти по-висока, отколкото при RAS мутантните. При пациентите в ранен стадий експресията на SIRT6 е по-ниска в сравнение с пациентите в напреднал стадий, при които тя е значително повишена.
2. Наблюдават се намалени нива на експресия на FOXO4 за всички пациенти, с по-висока експресия при RAS див тип и почти никаква промяна в RAS мутантните. При пациентите в стадии IIa и IV експресията на FOXO4 е понижена. При пациентите в стадий IIIb FOXO4 експресията е значително повишена.
3. Идентифицирана е увеличена експресия на HIF3A за всички пациенти и сходно висока експресия при RAS див тип и RAS мутантни. Туморите от пациенти от стадии IIa и IIIb показват повишена експресия на HIF3A, обратно на понижената експресия в стадий IV.

Корелация между нивата на експресия на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гените при пациенти с КРК, според RAS мутационния статус и стадирането:

4. Наблюдавана е значителна средна степен на корелация между нивата на генна експресия на SIRT6 и FOXO4, SIRT6 и HIF3A при всички пациенти.
5. Наблюдавана е значителна средна степен на корелация между нивата на генна експресия на SIRT6 и FOXO4 при RAS мутантните и между SIRT6 и HIF3A при RAS див тип случаите.
6. Наблюдавана е значителна силна степен на корелация между нивата на генна експресия на SIRT6 и HIF3A при пациентите в стадий IV.

Анализ на нивата на експресията на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 мРНК при пациенти с КРК, според RAS мутационния статус и стадирането:

7. За всички пациенти се наблюдава намалена експресия на miR-143, miR-101, miR-34b и miR-375 и липса на промяна в експресията на miR-200c в сравнение със здравата съседна тъкан от дебело черво.
8. За тумори с мутирали RAS са установени повишени нива на miR-200c и miR-34b, понижени нива на miR-375 и липса на промяна в нивата на експресия на miR-143 и miR-101.
9. За пациентите див тип по RAS са установени понижени нива на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375.
10. За стадий IIa, е установено намаляване на нивата на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375. За пациентите в IIIb стадий, се откриват повишени нива miR-200c и miR-101 и липса на промяна за miR-143, miR-34b и miR-375. За IV-стадий, са установени намалени нива на miR-200c, miR-101 и miR-375 и липса на промяна за miR-143 и miR-34b.

Корелация на нивата на експресия на гените SIRT6, FOXO4 и HIF3A с нивата на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 миРНК:

11. Наблюдавана е значителна средна степен на корелация между нивата на генна експресия на SIRT6 и miR-375 по отношение на всички пациенти, значителна средна степен на корелация между FOXO4 и miR-375 за всички пациенти и за мутантни RAS случаи.

12. Наблюдавана е значителна средна степен на корелация между нивата на генна експресия на SIRT6 и miR-34b за всички пациенти и мутантни RAS случаи.

13. Наблюдавана е значителна средна степен на корелация между нивата на генна експресия на FOXO4 и miR-34b за RAS мутантни и значителна средна отрицателна корелация между FOXO4 и miR-143 за RAS див тип случаите.

Оптимизиране на протокола за молекулярнен анализ:

14. Комбинацията от лизиращ буфер с екстракция на РНК с фенол води до най-високи добиви от РНК.

15. Ген-специфичният синтез на кДНК води до продукция на повишен брой прицелни кДНК.

16. Преамплификацията на кДНК увеличава количеството на матрицата на анализирания ген и намалява стойността на Ct, подобрявайки чувствителността на реакцията.

Приноси

За първи път протоколът за молекулярен анализ на експресията на гени и miRNA от FFPE е оптимизиран чрез комбиниране на подобрени методи за изолиране на РНК, синтез на кДНК и преамплификация.

За първи път експресионните нива на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гени са определени в комбинация за пациенти с КРК съвкупно, според RAS мутационния статус и спрямо IIa, IIIb и IV стадии на развитие на тумора.

За първи път е определена корелация между експресиите на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гени за пациенти с КРК съвкупно, според RAS мутационния им статус и според IIa, IIIb и IV стадии на развитие на тумора.

За първи път са определени експресионните нива на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 miRNAs в комбинация за пациенти с КРК съвкупно, според RAS мутационния статус и според IIa, IIIb и IV стадии на развитие на тумора.

За първи път е определена корелацията между експресионните нива на miR-143, miR-200c, miR-101, miR-34b и miR-375 и експресията на SIRT6, FOXO4 и HIF3A гени за пациенти с КРК съвкупно, според RAS мутационния им статус и според IIa, IIIb и IV стадии на развитие на тумора.

Финансиране

Медицински Университет Варна (2016), фонд “Наука” проект No 16020, подкрепи това проучване.

Списък на често използваните съкращения

KPK	колоректален карцином (CRC)
AKT	протеин киназа Б (PKB-Protein kinase B)
AMPK	АМР-активирана протеин киназа
ASR	стандартизирано съотношение спрямо възраст
COX-2	циклооксигеназа 2
CSS	специфична причина на преживяемост
DNMT3	ДНК-метилтрансфераза 3
EGFR	рецептор на епидермалния фактор на растеж
EMT	епително-мезенхимална трансформация
FFPE	фиксирана в формалин и парафинизирана тъкан
FOXO4	форкхед бокс 4 (Forkhead box 4)
HIF3A	хипоксично индуциран фактор 3А (Hypoxia-inducible factor 3A)
FOBT	окултен кръвен тест на фекалите
HR	съотношение на опасност (hazard ratio)
mAb	моноклонално антитяло
MAPK	митоген-активирана протеин киназа
OS	обща преживяемост
PFS	преживяемост без прогресия (progression free survival)
PI3K	фосфатидилинозитол 3 киназа
RT-qPCR	обратна транскрипция- количествена полимеразна верижна реакция
RAS MUT	RAS мутантни
RAS WT	RAS див тип
SIRT6	сиртуин 6 (sirtuin 6)
TCA	трикарбоновите киселини
UTR	нетранслационен район (untranslated region)

Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд

1. **Dimaras P.**, Tasinov O., Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2017**. Improving silica-based spin-column efficiency for RNA isolation from FFPE tissue. *Scripta Scientifica Medica*, v. 49, n. 2, jun. 2017, 7-11.
2. **Dimaras P.**, Tasinov O., Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2017**. Increasing detection sensitivity of low copy number transcripts through preamplification of cDNA molecules. *Scripta Scientifica Medica*, v. 49, n. 2, jun. 2017, 12-16.
3. **Dimaras P.**, Tasinov O., Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2017**. SIRT6, FOXO4, HIF3A: Unlocking key metabolic regulators in cancer cells. *Scripta Scientifica Medica*, In Press.

Благодаря на всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

На моя научен ръководител проф. Д. Иванова, дбн за оказаната подкрепа и напътствия.

На гл. ас. Оскан Тасинов, дб, гл. ас. Десислава Иванова, дб и доц. Йоанна Киселова-Канева, дб за тяхното съдействие и безценни съвети.

На всички колеги от Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика за помощта при изпълнението на дисертационния труд и семеена атмосфера.

На моето семейство и приятели за доверието, подкрепата и търпението.